

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT
(Paris 7)

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT

Spécialité : Physique

École Doctorale : Interdisciplinaire pour le Vivant (ED 387)

**Relation entre forme, tension et adhésion au cours
de l'étalement d'une cellule animale**

présentée

par

JONATHAN FOUCHARD

Soutenue le 23 Novembre 2012 devant le Jury composé de :

Julie PLASTINO

Abdul BARAKAT

Alexander BERSHADSKY

Yves COUDER

Pierre-François LENNE

Atef ASNACIOS

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur

Remerciements

Cette thèse n'est pas l'œuvre d'une personne. Ce n'est pas de la fausse modestie que d'écrire ça ; au contraire, c'est reconnaître la force d'un collectif. Ils ont été nombreux ceux qui ont participé à ce travail. Et ce travail naturellement leur appartient.

Je les remercie tous pour ce qu'ils sont. Durant plus de trois années, il n'y a pas un matin où je ne me sois levé sans l'envie de retrouver le laboratoire, les gens que je cite ici y sont pour une grande part.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté avec sympathie de juger ce travail.

*

Cette thèse fut inspirée par les travaux de Nicolas Desprat et Démosthène Mitrossilis, dirigés par Atef Asnacios.

Célian Bimbard, Nathalie Bufi, Olivier de Freitas, Pauline Durand et Alain Richert ont réalisé quelques unes des expériences décrites ici.

Pour le traitement d'images et les divers problèmes informatiques, il y avait Olivier Cardoso.

Jean-Louis Counord a conçu les pièces mécaniques ; Laurent Réa et Alexandre Lantheaume les ont façonné.

Pour l'électronique, il y avait Jacques Servais et Arnaud Grados.

Alain Richert faisait la culture cellulaire.

Booboo était l'ingénieure chimiste ; Nathalie Luciani était l'ingénieure biologiste.

Carole Barache, Nadine Beyer, Lucie Bouchu et Danielle Champeau s'occupaient de la comptabilité et de l'administration.

Pour les discussions scientifiques, il y avait Hélène Conjeau, Jocelyn Etienne, Cyprien Gay, François Gallet, Sylvie Hénon, Jean-Pierre Henri, Démosthène Mitrossilis, Amsha Proag et Michel Seigneuret.

Yves Couder et les dames du RU étaient là aussi.

Avec Atef Asnacios, Sophie Asnacios, Pierre Bohec, Nathalie Bufi, Olivier Cardoso, Elisabeth Charrier, Loudji Chevy, Hélène Conjeau, Jean-Louis Counord, Marc-Antoine Fardin, Olivier de Freitas, Pauline Durand, Guillaume Frasca, Gérald Gurtner,

Félix Lebois, Sandra Lerouge, Michael Lévy, Démosthène Mitrossilis, Amscha Proag, Giuseppe Pucci, Laurent Réa, Alain Richert, Damien Robert et Michel Seigneuret, nous refaisons régulièrement le monde.

Sarah Dulaurier, Claire Fauveau et Nathalie Bufi étaient là dans l'intime quotidienneté.

Cette thèse fut dirigée par l'original et saisissant Atef Asnacios.

C'est Jean-Luc Godard qui a inspiré ces remerciements.

Table des matières

Avant-propos	1
1 Contexte général (ou Comment des facteurs mécaniques peuvent influencer la physiologie d'une cellule animale ?)	5
1.1 Forme d'une cellule animale	9
1.1.1 Généralités sur la cellule animale	9
1.1.2 Forme et tension superficielle	10
1.1.3 Acteurs biologiques à l'origine de la forme	11
1.2 Un matériau mou en équilibre dynamique dans un matériau mou en équilibre dynamique	18
1.2.1 Mécanique de l'intérieur	18
1.2.2 Mécanique de l'extérieur	33
1.3 L'environnement mécanique influence la vie des cellules animales - Évidences expérimentales	39
1.3.1 Confinement géométrique	39
1.3.2 Rigidité du substrat	41
1.3.3 Étirement - cisaillement - compression	45
1.3.4 En bilan	49
1.3.5 Les cellules façonnent leur environnement mécanique (supplément de complexité)	51
1.4 Mécanismes d'intégration des signaux mécaniques	53
1.4.1 Réponse du cytosquelette à l'échelle globale	53
1.4.2 Détection de l'environnement mécanique à l'échelle locale	56
1.4.3 Régulation génétique à partir d'information mécanique	58
1.4.4 Vers une vision intégrée de la mécano-transduction	60
1.5 Conclusions du chapitre et objectifs de la thèse	63
2 Cinétique de l'étalement sur substrat plan, forme cellulaire et formation des complexes d'adhésion	67
2.1 Contexte particulier : Étalement précoce de cellules animales	71
2.1.1 Éléments expérimentaux	71
2.1.2 Approches physiques	75
2.1.3 Approches biologiques	76
2.1.4 Approche intermédiaire	77
2.2 Résultats expérimentaux	79
2.2.1 Procédure expérimentale et méthode d'analyse	79

2.2.2	Cinétique du rayon cellulaire	80
2.2.3	Dynamique des complexes d'adhésion	82
2.2.4	Corrélation entre cinétique de l'étalement et formation des complexes d'adhésion	85
2.2.5	Seuil d'apparition des adhésions - Angle de contact du corps cellulaire	87
2.2.6	Effet de la tension interne sur l'étalement et la dynamique des complexes d'adhésion	90
2.2.7	Effet de la spécificité du substrat et de la densité de ligands . .	94
2.2.8	Morphologie de la membrane au cours de l'étalement	97
2.3	Discussion et perspectives	99
2.3.1	Vers un modèle intégré de l'étalement cellulaire	99
2.3.2	Perspectives	102
3	Forme, force, adhésions : étalement d'une cellule entre deux plaques	107
3.1	Dispositif expérimental	111
3.1.1	Principe et géométrie du dispositif	111
3.1.2	Dispositif de détection de la force	111
3.1.3	Interfacage et rétroaction	118
3.1.4	Limites du dispositif	119
3.1.5	Procédure expérimentale	121
3.2	Résultats expérimentaux	122
3.2.1	Observations générales	122
3.2.2	Étalement, force et adhésions	122
3.2.3	Corrélation entre cinétique de l'étalement et formation des complexes d'adhésion	126
3.2.4	Corrélation entre apparition de la force et des adhésions - Effet de la raideur	127
3.2.5	Variation des paramètres de transition selon la raideur	129
3.2.6	Croissance de la force et des adhésions - Expériences à raideur variable	129
3.2.7	Saturation de la force et des adhésions	130
3.3	Discussion et perspectives	132
3.3.1	Discussion	132
3.3.2	Perspectives	137
4	Comparaison entre étalement cellulaire sur substrat plan et entre deux plaques	141
4.1	Résultats expérimentaux	145
4.1.1	Observations générales	145
4.1.2	Première phase et transition de l'étalement	146
4.1.3	Croissance des adhésions et état final	147
4.2	Discussion et perspectives	148
4.2.1	Discussion	148
4.2.2	Perspectives	149
4.3	Résumé des résultats obtenus dans les chapitres 2,3 et 4	152

Conclusion	155
Tableau récapitulatif des paramètres caractéristiques de l'étalement	159
A Traitement d'image et analyse	161
B Photo-blanchiment et phototoxicité	165
C Fabrication des motifs adhésifs	169
D Marquages et microscopie confocale	171
E Calibration et lavage des lamelles	173
Bibliographie	175

Avant-propos

Le manuscrit que vous vous apprêtez à lire est le résumé de 3 ans de travaux expérimentaux à la frontière de la physique et de la biologie. L'ambition très lointaine de ce travail est de comprendre comment un animal se développe, parvient à une forme et une organisation qui lui permettent de survivre dans son environnement.

Évidemment, nous ne prétendons pas résoudre ici cette question. Pour l'instant, nous allons donc réduire cet objet, l'animal, à son constituant élémentaire, la cellule. Les animaux sont en effet des métazoaires, c'est-à-dire qu'ils sont composés de plusieurs cellules, souvent des milliards, souvent différenciées et réunies en organes pour réaliser une fonction particulière au sein de l'animal. Mais, si comme souvent en science, il peut être utile de réduire son objet d'étude à son constituant élémentaire, faire de la cellule animale un objet autonome capable de régler sa vie en fonction de la seule information génétique contenue dans son noyau est de toute évidence une fausse route. En effet, la cellule à l'état naturel, vit dans des tissus constitués d'autres cellules, de matrice et de facteurs solubles ayant chacun leur propre dynamique. Ainsi, les cellules interagissent entre elles et avec cet environnement, par exemple en échangeant des constituants chimiques (facteurs de croissance, facteurs d'inflammation) ou encore en subissant les efforts mécaniques auxquels l'ensemble du corps est soumis.

Il y a une vingtaine d'années des chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'influence du micro-environnement mécanique sur la vie des cellules. En développant des outils issus de la physique de la matière molle et de la physico-chimie couplés à des techniques de biologie cellulaire plus classiques, ils ont d'abord cherché à comprendre comment les cellules se déforment sous l'effet de contraintes mécaniques extérieures mais aussi comment elles appliquent des contraintes vers l'extérieur (notamment pour se mouvoir). Finalement, ils ont pu montrer que le micro-environnement mécanique peut orienter des processus cellulaires aussi divers que complexes, comme la migration ou la différenciation.

Le laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), où s'est effectuée cette thèse, possède une grande expérience dans ce domaine de la recherche que l'on nomme la *mécanique cellulaire*. Ainsi, mon directeur de thèse, Atef Asnacios, avec d'autres chercheurs du laboratoire (Sylvie Hénon, François Gallet) a participé à caractériser les propriétés mécaniques passives d'une cellule animale. Pour cela, il mit au point, avec l'aide de Nicolas Desprat son premier doctorant, un dispositif, le rhéomètre à cellule unique, composé de deux micro-plaques de verre et capable d'étirer une cellule isolée de manière contrôlée et d'en déduire sa rhéologie.

Cet instrument a ensuite été détourné et utilisé par Axel Guiroy et Démosthène Mitrossilis dans leurs thèses respectives pour mesurer des forces de traction à l'échelle de la cellule entière. Ils ont ainsi pu montrer, d'une part, que la cellule adapte la force

qu'elle développe à la raideur de son substrat et, d'autre part, qu'elle adapte cette force en un temps étonnamment rapide (inférieur à 0,1 seconde).

Or, avant ces mesures, plusieurs modèles avançaient l'idée que l'adaptation des cellules à la raideur de leur environnement était due à des cascades de signalisation biochimiques partant des complexes d'adhésion, ces complexes protéiques qui font le lien mécanique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Mais de tels modèles, basés sur des réactions en chaînes partant de points très localisés, impliquent des temps de réponse beaucoup plus longs que la réponse quasi-instantanée observée à l'échelle de la cellule. En revanche, si la force s'adapte à la raideur, cette force doit bien être transmise au substrat. On peut donc s'attendre à ce que les complexes d'adhésion s'adaptent eux aussi à la raideur de l'environnement en réponse à l'adaptation de la force, et non plus l'inverse comme on pouvait le penser auparavant.

La question à laquelle nous avons cherché à répondre dans cette thèse était la suivante : comment la formation des complexes d'adhésion se coordonne avec la contractilité cellulaire pour permettre cette réponse particulière à la raideur ? Pour y répondre, nous avons mis au point un dispositif expérimental nouveau, inspiré du rhéomètre à cellule unique, qui nous a permis de mesurer des forces de traction à l'échelle cellulaire, d'observer l'organisation des complexes d'adhésion tout au long de la traction et de modifier en temps réel la raideur ressentie par la cellule pendant ce processus.

La construction de ce dispositif a représenté la majeure partie du temps consacré à ma thèse. La réalisation d'un tel projet n'aurait pas été possible sans le savoir-faire en mécanique et en électronique propre à un laboratoire de physique comme le MSC. Je tiens donc à remercier ici tout particulièrement les ingénieurs et techniciens qui m'ont permis d'aller au bout de ce projet : Jean-Louis Counord, Laurent Réa, Jacques Servais. De plus, si j'ai pu consacrer autant de temps au montage de ce dispositif et à l'analyse des résultats qui suivirent, c'est grâce à l'aide quotidienne d'Alain Richert, notamment pour le travail de culture cellulaire. Je le remercie pour ça et tout le reste.

Enfin, il me semble important d'avertir le lecteur sur un dernier point. Nous abordons dans cette thèse un problème, certes de nature biologique, mais avec un passé et un état d'esprit de physiciens - mon directeur de thèse est physicien de la matière molle, j'ai moi-même étudié la physique jusqu'en Master 2. Cette culture de la physique nous a bien sûr aidés à construire notre dispositif expérimental, mais elle influence surtout toute notre conception de la cellule et nous contraint à considérer cet objet d'une manière qui peut sembler étrange, en particulier à un biologiste. En effet, la cellule est pour nous avant tout un bout de matière complexe possédant certaines propriétés atypiques d'où peuvent émerger des comportements inhabituels de la matière, comportements qui ont pu être sélectionnés et adaptés au cours de l'évolution pour aujourd'hui être exploités par les cellules afin de réaliser diverses fonctions biologiques. Cette conception est plus qu'un parti pris, c'est presque une croyance héritée de notre génome de physiciens. Elle présente l'avantage d'être originale dans le contexte actuel encore très moléculaire des études de biologie cellulaire, mais elle a l'inconvénient de nous faire parfois oublier la complexité biologique propre à la cellule eucaryote.

Voici maintenant comment sera découpé notre manuscrit. Dans un premier temps, nous présenterons le contexte général de l'étude ; nous nous demanderons en particulier comment les cellules animales peuvent sentir un signal mécanique extérieur et y

répondre. Nous insisterons alors sur le rôle prépondérant que jouent la contractilité acto-myosine et les complexes d'adhésions dans cette sensibilité.

Dans un deuxième temps, nous présenterons une étude sur l'étalement précoce de fibroblastes sur un substrat plan et la dynamique de formation des complexes d'adhésion pendant ce processus. Nous verrons alors qu'il existe une coordination entre changement de forme de la cellule durant l'étalement et apparition des complexes d'adhésion.

Nous nous servirons de ce travail comme d'une prémisse au troisième chapitre qui sera le cœur de cette thèse. Dans cette partie, nous décrirons d'abord le dispositif de mesure de force de traction cellulaire que nous avons mis au point, puis nous évoquerons les corrélations que nous avons mises en évidence entre étalement cellulaire, formation des complexes d'adhésion et force de traction transmise au substrat.

Le quatrième chapitre sera un court compte-rendu évoquant les différences et points communs notables dans le motif adhésif lorsqu'une cellule s'étale soit sur un substrat plan, soit entre deux plaques parallèles.

Enfin, nous conclurons par une synthèse de ces résultats et de leurs limites et finirons par les perspectives qui y sont associées.

CHAPITRE 1

Contexte général (ou Comment des facteurs mécaniques peuvent influencer la physiologie d'une cellule animale ?)

Sommaire

1.1	Forme d'une cellule animale	9
1.1.1	Généralités sur la cellule animale	9
1.1.2	Forme et tension superficielle	10
1.1.3	Acteurs biologiques à l'origine de la forme	11
1.2	Un matériau mou en équilibre dynamique dans un matériau mou en équilibre dynamique	18
1.2.1	Mécanique de l'intérieur	18
1.2.2	Mécanique de l'extérieur	33
1.3	L'environnement mécanique influence la vie des cellules animales - Évidences expérimentales	39
1.3.1	Confinement géométrique	39
1.3.2	Rigidité du substrat	41
1.3.3	Étirement - cisaillement - compression	45
1.3.4	En bilan	49
1.3.5	Les cellules façonnent leur environnement mécanique (supplément de complexité)	51
1.4	Mécanismes d'intégration des signaux mécaniques	53
1.4.1	Réponse du cytosquelette à l'échelle globale	53
1.4.2	Détection de l'environnement mécanique à l'échelle locale	56
1.4.3	Régulation génétique à partir d'information mécanique	58
1.4.4	Vers une vision intégrée de la mécano-transduction	60
1.5	Conclusions du chapitre et objectifs de la thèse	63

Dans ce chapitre, nous cherchons à comprendre à partir de la littérature existante comment des facteurs mécaniques peuvent influencer la physiologie d'une cellule animale. A l'origine de cette question se trouve donc un problème mécanique. Or, en mécanique, il s'agit toujours de savoir comment un objet se meut et/ou se déforme en réponse à des forces internes ou externes. Pour avoir un aperçu du problème, nous nous demanderons donc en premier lieu quelles formes peut prendre une cellule animale ; ce sera l'objet de la première section de ce chapitre.

Ensuite, nous verrons à quel point cette cellule est déformable depuis l'extérieur en s'intéressant aux composants responsables de ses propriétés mécaniques, mais aussi à quel point elle est capable de se déformer par elle-même sous l'effet de forces internes. Notons au passage que forme cellulaire, propriétés mécaniques et organisation des composants dans l'espace sont des notions interdépendantes. Nous les réunirons autour du concept d'*architecture cellulaire*.

Cette notion sera centrale ici, car par la suite nous traiterons de la sensibilité des cellules à l'environnement mécanique. Or, on ne construit pas un bâtiment de la même manière sur un terrain dur ou mou, large ou non (surtout à volume donné) ou bien si le bâtiment est soumis ou non au vent ! En bref, autant que le matériau lui-même, son environnement déterminera la répartition des contraintes dans le matériau, c'est-à-dire son architecture. Nous verrons ainsi dans la troisième section que l'environnement mécanique des cellules peut modifier leur architecture mais aussi contrôler des paramètres biologiques plus complexes, par exemple leur phénotype.

Nous serons alors amenés dans la section 4 à chercher les acteurs biologiques qui permettent à la cellule d'intégrer les signaux mécaniques. Nous verrons que deux candidats évidents sont aussi des acteurs importants pour la formation de l'architecture cellulaire ; il s'agit du cytosquelette d'actine (associé à la myosine) et des complexes d'adhésion.

Ainsi, nous arriverons naturellement aux objectifs de cette thèse, à savoir comprendre la coordination entre contractilité acto-myosine et formation des complexes d'adhésion lorsqu'une cellule change de forme, et ce, dans différents environnements mécaniques.

1.1 Forme d'une cellule animale

1.1.1 Généralités sur la cellule animale

Comme l'énonce la théorie cellulaire, tous les êtres vivants sont composés d'une ou plusieurs cellules et toutes les cellules naissent d'une autre cellule. Les animaux sont donc composés de cellules, en particulier de cellules dites eucaryotes, c'est-à-dire que leur bagage génétique est situé dans un compartiment que l'on nomme le noyau. Le terme de *cellule* vient du fait que cet objet peut être décomposé en un intérieur et un extérieur, la frontière entre les deux étant formée par la membrane plasmique (Fig 1.1). Nous détaillerons les propriétés de cette membrane dans la deuxième section ; pour l'instant, nous nous contenterons de savoir que cette membrane est semi-perméable.

A l'intérieur de la cellule se trouve un milieu aqueux, appelé cytoplasme, composé d'un très grand nombre d'ions et de molécules, qui peuvent s'associer pour former des structures mesurant jusqu'à plusieurs microns (Fig 1.1). Parmi ces molécules, on trouve les protéines, qui permettent aux cellules de réaliser la plupart de leurs fonctions au moyen d'interactions complexes. Ces protéines sont le résultat de la transcription de l'ADN en ARN puis de la traduction de cet ARN *via* l'assemblage d'acides aminés. On associe généralement une protéine à une séquence codante de la molécule d'ADN, que l'on nomme gène. On estime qu'un humain possède environ 20000 gènes. Toutefois, il existe des mécanismes (épissage alternatif notamment) qui font qu'à un seul gène peuvent être associées plusieurs protéines ; de plus, la plupart des protéines possèdent plusieurs états qui peuvent être atteints par l'intervention de réactions enzymatiques (méthylation, phosphorylation,...). Ainsi un grand nombre de protéines différentes actives ou non actives peuvent coexister dans une cellule, chacune étant présente en un grand nombre d'exemplaires.

Toutefois, toutes les protéines possibles chez un individu donné ne sont pas exprimées en même temps et de la même façon dans chaque cellule de son organisme. Certaines seront par exemple exprimées en grand nombre dans beaucoup de cellules, d'autres au contraire ne seront jamais exprimées sauf à certaines étapes de son développement. La composition en protéines exprimées à un instant donné dans la cellule définit son *phénotype moléculaire*. Ce phénotype est étroitement lié au *phénotype cellulaire* à travers les interactions que peuvent former les protéines entre elles et avec l'extérieur, et qui peuvent donner naissance à des comportements macroscopiques¹. Ainsi, les cellules peuvent se spécialiser - il existe plus de 200 types cellulaires chez l'Homme - et s'associer en organes réalisant des fonctions pour l'organisme tel que marcher, digérer ou respirer.

Une autre donnée fondamentale pour un physicien qui s'intéresse aux cellules vivantes est leur caractère hors d'équilibre. En effet, pour se maintenir en vie la cellule doit en permanence transformer des éléments chimiques, les transporter, les digérer, etc. Cette activité métabolique est rendue possible par la production puis l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP), produite dans les mitochondries chez les animaux. Nous verrons par la suite que les cellules sont capables de transformer cette énergie

1. Dans la deuxième section de ce chapitre, nous nous attarderons sur les protéines qui jouent un rôle mécanique dans la cellule (notamment celles du cytosquelette et des adhésions).

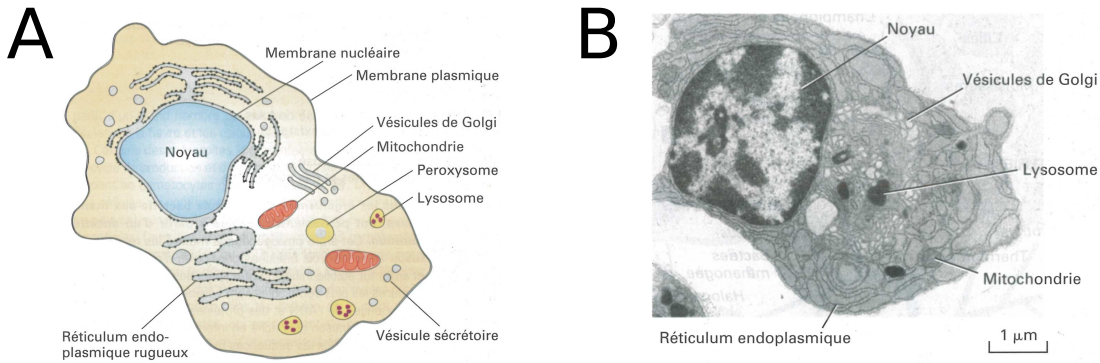


FIGURE 1.1 – A- Schéma d'une cellule eucaryote et de ses organites. B- Micrographie électronique montrant l'organisation interne d'un plasmocyte (globule blanc) [Lodish *et al.*, 1995].

biochimique en énergie mécanique notamment pour maintenir une forme ou pour se mouvoir.

En résumé, une cellule vivante est composée d'entités très différentes, changeantes, en mouvement permanent, arrangées en structures et sous-structures, à la fois connectées et autonomes, sous l'emprise d'un code mais aussi de son environnement. En d'autres termes, une cellule est une capsule de $10\mu\text{m}$ débordante de complexité, certainement pire en ce domaine qu'une grande agglomération. Faire de la physique sur un tel objet peut dès lors sembler un projet perdu d'avance. Nous verrons cependant qu'il est possible de dire des choses assez solides sur les aspects mécaniques propres à la cellule, et que ces données peuvent être exploitables pour résoudre des problèmes biologiques plus larges.

1.1.2 Forme et tension superficielle

Tout d'abord, afin d'avoir un rapide aperçu de notre problème, avant tout d'ordre mécanique comme nous le disions, observons quelles formes peut prendre une cellule animale à l'équilibre; nous verrons ainsi très vite quels acteurs sont susceptibles de produire ces formes.

Commençons par un constat simple : une cellule en suspension est sphérique, toute personne ayant fait des expériences sur des cellules isolées en témoignera. Or, la cellule est un milieu aqueux évoluant dans un autre milieu aqueux. On peut donc a priori lui appliquer la loi de Laplace, qui s'écrit, de manière générale :

$$p_{cell} - p_{ext} = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (1.1)$$

où p_{cell} et p_{ext} représentent les pressions hydrostatiques dans la cellule et le milieu extérieur respectivement, γ la tension superficielle et R_1 et R_2 les rayons de courbure principaux.

Cette relation devient donc pour un objet sphérique :

$$p_{cell} - p_{ext} = \frac{2\gamma}{R} \quad (1.2)$$

où R est le rayon de l'objet.

Ainsi, la forme finale de la cellule en suspension - et en particulier sa taille - est donnée par la différence entre pression interne et pression externe compensée par un terme de tension superficielle. Les pressions internes et externes peuvent varier en ajustant la composition et le nombre de macro-molécules dans ces deux milieux. Quant au terme de tension superficielle, nous chercherons son origine dans le prochain paragraphe.

Mais les idées de ce genre ne datent pas d'hier. Dès le début du XX^{ème} siècle, Sir D'Arcy Wentworth Thompson eut l'intuition que les formes des cellules pouvaient être gouvernées par la tension superficielle. Ainsi, selon lui, on devait pouvoir retrouver la diversité des formes cellulaires parmi l'ensemble des formes de surfaces minimales prévisibles par la loi de Laplace, à savoir les surfaces de révolution de Plateau [D'arcy, 1963]. Ces surfaces sont la sphère, le cylindre, la caténoïde, l'onduloïde et le nodoïde. D'Arcy Thompson a cherché - et trouvé - des cellules prenant ces formes parfois étranges parmi les micro-organismes marins. Mais des surfaces très semblables peuvent être produites aujourd'hui à l'aide de cellules modèles cultivables en laboratoire. Ceci a déjà été réalisé dans notre laboratoire à l'aide du rhéomètre à cellule unique où, en étirant ou en laissant s'étaler des cellules entre deux micro-plaques de verre, on peut observer quatre des cinq surfaces décrites par Plateau (Fig 1.2-A).

En outre, il existe d'autres analogies de formes entre cellules et objets gouvernés par des phénomènes de tension superficielle. Ainsi, à l'instar des gouttes qui mouillent ou non leur substrat selon la valeur du paramètre d'étalement, une cellule prendra une forme plus ou moins ronde selon les propriétés chimiques de son substrat [Reinhart-King *et al.*, 2005]. De plus, on peut distinguer à l'avant des cellules étalées un film très fin d'épaisseur constante, qui rappelle le film d'épaisseur moléculaire situé à l'avant des gouttes mouillantes (film dit "précurseur" ou "de pré-mouillage") (Fig 1.2-B).

Enfin, l'organisation des cellules à certains stades du développement de nombreux organismes, par exemple les organismes modèles comme le poisson zèbre ou la drosophile, prend une forme très ordonnée qui fait penser à une mousse à deux dimensions où la plupart des cellules possèdent une forme hexagonale (Fig 1.2-C).

1.1.3 Acteurs biologiques à l'origine de la forme

Même s'il ne s'agit ici que d'analogies, l'idée d'une forme cellulaire gouvernée par une énergie assimilable à une tension superficielle semble donc séduisante. Reste à savoir l'origine de cette tension ; en effet, une cellule est un objet complexe et ses interactions de surface ne peuvent être réduites à des forces de Van der Waals comme c'est le cas pour une goutte classique.

La membrane plasmique, responsable de la forme locale

La première idée imaginable quant à l'origine de cette tension serait la membrane plasmique. D'une part, car cette membrane est à l'interface entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (comme les molécules responsables des forces de Van der Waals), d'autre part car elle est semi-perméable et peut ainsi contrôler la pression osmotique dans la cellule en laissant passer ou non des ions à travers ses pores. Cette double-propriété de rôle à l'interface et de lien avec la pression fait donc de la membrane un candidat évident.

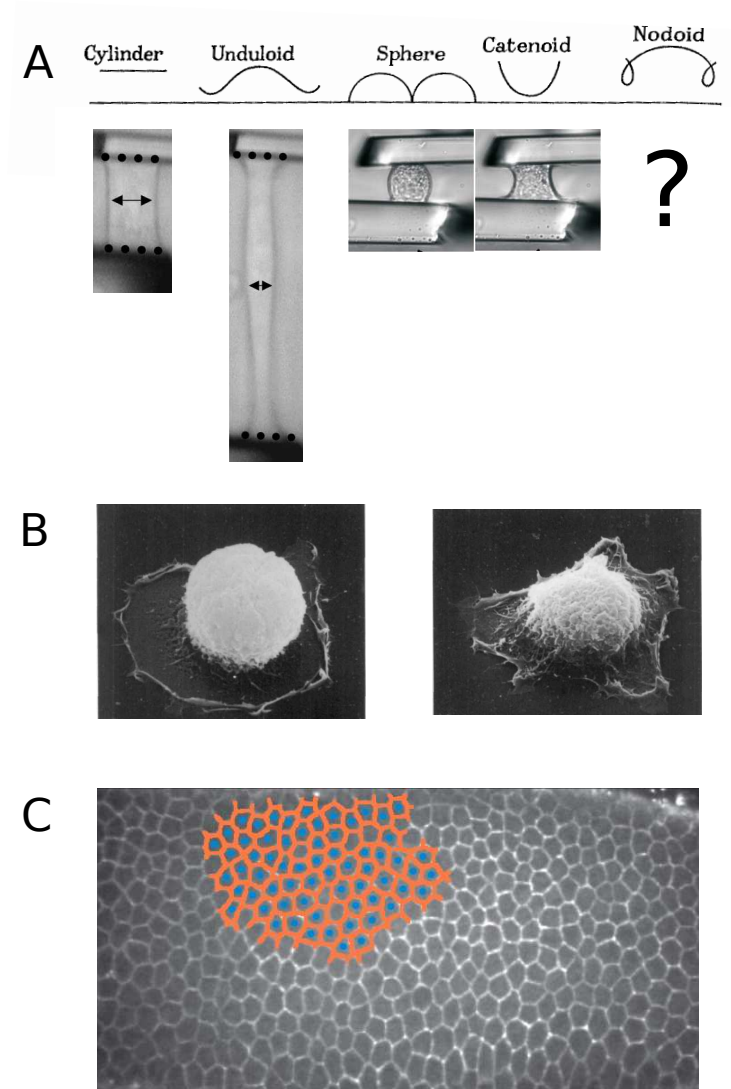


FIGURE 1.2 – A- Analogie entre surfaces prédites par la loi de Laplace [D'arcy, 1963] et formes cellulaires obtenues dans le rhéomètre à cellule unique [Desprat *et al.*, 2005; Mitrossilis *et al.*, 2009]. B- Images en microscopie électronique de cellules en étalement. Une fine couche protrusive à l'avant rappelle le film de pré-mouillage présent dans les gouttes mouillantes [Bereiter-Hahn *et al.*, 1990]. C- Image en microscopie confocal d'un embryon de drosophile pendant l'extension de la bande germinale. La cadhérine est marquée et fait apparaître les bords des cellules [Rauzi *et al.*, 2008].

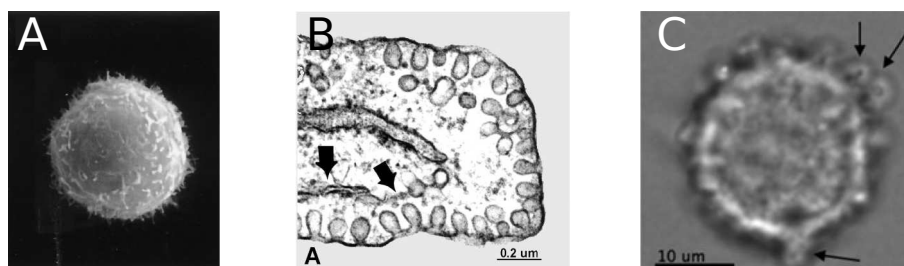


FIGURE 1.3 – Différents types de réservoir de membrane. A- Image en microscopie électronique montrant les microvillis en surface [Guilak *et al.* , 2002]. B- Caveolae observés en microscopie électronique [Anderson, 1998]. C- Blebs observés en lumière blanche [Norman *et al.* , 2010].

Cependant, si on regarde de près une cellule en suspension, on observe à sa surface des invaginations de membrane que l'on nomme en anglais *ruffles* ou *microvillis* (Fig 1.3-A). Ceci indique que la membrane plasmique n'est en général pas tendue.

De plus, il est connu qu'une cellule étalée possède un réservoir de membrane par le biais de petites poches (d'un dixième de microns environ) que l'on nomme *caveolae* (Fig 1.3-B). Dans une certaine mesure, la tension membranaire est ainsi régulée - ou tamponnée - par cette réserve et ne varie pas lors des changements de formes cellulaires [Sinha *et al.* , 2011].

Enfin, les cellules peuvent par moment montrer des *blebs*, qui sont des excroissances membranaires qui apparaissent et disparaissent en quelques secondes (Fig 1.3-C). Leur forme sphérique laisse penser que ces structures sont tendues. Par conséquent, le rayon typique des blebs (environ 500 nm) étant petit devant celui des cellules (environ 10 μm), l'équilibre des pressions et la loi de Laplace implique que la tension dans l'enveloppe cellulaire doit être bien plus importante que dans la membrane [Tinevez *et al.* , 2009].

Tous ces éléments nous montrent donc que la forme locale et la frontière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule sont gouvernées ou matérialisées par la membrane plasmique, mais que le terme de tension de surface qui donne la forme générale de la cellule doit avoir une autre origine.

Le cortex d'acto-myosine, responsable de la forme globale

Nous envisageons le cortex d'acto-myosine comme seconde hypothèse. Ce cortex est un réseau de polymères d'actine rendu contractile par la présence de moteurs moléculaires, les myosines².

On peut voir sur la figure 1.4-A (au centre) que lorsque la cellule est en suspension dans un milieu d'osmolarité normale, le cortex tapisse la surface interne de la membrane plasmique et possède une épaisseur d'environ un micron. Il conserve cette disposition dans un environnement hyper-osmotique, en maintenant une épaisseur quasi-constante alors que le diamètre cellulaire diminue (Fig 1.4-A, à droite). Toutefois, il semble se désagréger sous l'effet du gonflement de la cellule dans un environnement hypo-osmotique (Fig 1.4-A, à gauche) ; il ne pourrait alors résister à la surpression interne, ce qui remettrait en cause notre hypothèse. Au passage, on peut noter que plus

2. Nous fournirons de plus amples détails à son sujet dans la deuxième section.

la pression osmotique externe diminue, plus la membrane devient lisse à la surface de la cellule, ce qui confirme l'existence d'un réservoir de membrane à l'état basal, réservoir qui peut être consommé avec l'extension de la surface cellulaire.

Mais plusieurs autres éléments vont en faveur du rôle que pourrait jouer le cortex d'acto-myosine comme matériau créant une tension de surface.

Premièrement, des images en microscopie confocale d'une cellule étalée montrent que l'enveloppe corticale tapisse la surface cellulaire dans cette configuration également, tandis que le film de pré-mouillage dont nous parlions plus haut est remplie d'actine filamenteuse (Fig 1.4-B).

En outre, [Rauzi *et al.*, 2008] ont observé que, durant l'extension de la bande germinale d'un embryon de drosophile, un enrichissement en myosine II se produit aux jonctions perpendiculaires à l'allongement des cellules et du tissu. Cet enrichissement serait à l'origine de l'allongement des cellules dans le sens parallèle à celui du tissu, qui a lieu par des processus de transition T1 (Fig 1.4-C). Ces observations ont conduit les auteurs à modéliser ce phénomène par la minimisation d'une tension corticale (tension de ligne et/ou élastique), dont l'intensité locale serait proportionnelle à la densité de myosine II.

Enfin, le cortex d'acto-myosine joue un rôle important lors de la mitose. Ici, pendant la cytokinèse (séparation des deux cellules), le cortex forme un anneau contractile à la jonction entre les deux cellules, qui ressemblent alors à deux bulles côte-à-côte. Il va ainsi participer à créer deux compartiments afin de séparer les deux cellules filles (Fig 1.4-D).

Malgré la grande variété de tous ces phénomènes on retrouve à chaque fois le cortex d'acto-myosine qui semble gouverner la forme globale de la cellule en créant une tension interfaciale. On ne connaît cependant pas encore la signification de cette tension (tension de ligne, tension élastique ou les deux à la fois).

Besoin d'adhésions

Plusieurs expériences apparaissent cependant contradictoires avec le développement précédent. Par exemple, l'inhibition contrôlée de la polymérisation de l'actine par l'emploi de latrunculine A³ à des concentrations variables provoque un arrondissement des cellules auparavant étalées, qui laissent derrière elles de fins filaments collés au substrat⁴ (Fig 1.5-A). L'inhibition de la myosine à l'aide de blebbistatine a exactement les mêmes conséquences (Fig 1.5-B). Ceci indique que l'interaction entre les deux protéines est nécessaire pour maintenir la cellule étalée. De plus, cet effet est réversible; c'est-à-dire que le rinçage des drogues en question provoque un ré-étalement du corps cellulaire.

Par conséquent, si dans le paragraphe précédent, la tension du cortex semblait minimiser l'aire globale de la cellule, ici il semble à l'inverse qu'elle maintienne la cellule étalée. D'autre part, il faut se souvenir que le cortex est situé à l'intérieur du cytoplasme; au contraire de la membrane, il n'est donc pas directement en contact avec

3. La latrunculine A a la caractéristique de se lier à l'actine globulaire l'empêchant ainsi de polymériser; ceci a pour conséquence de diminuer la capacité globale de polymérisation mais aussi la vitesse de polymérisation.

4. Ces filaments font d'ailleurs penser aux fibres de rétraction qui persistent pendant la mitose et permettent l'étalement post-mitotique des cellules filles.

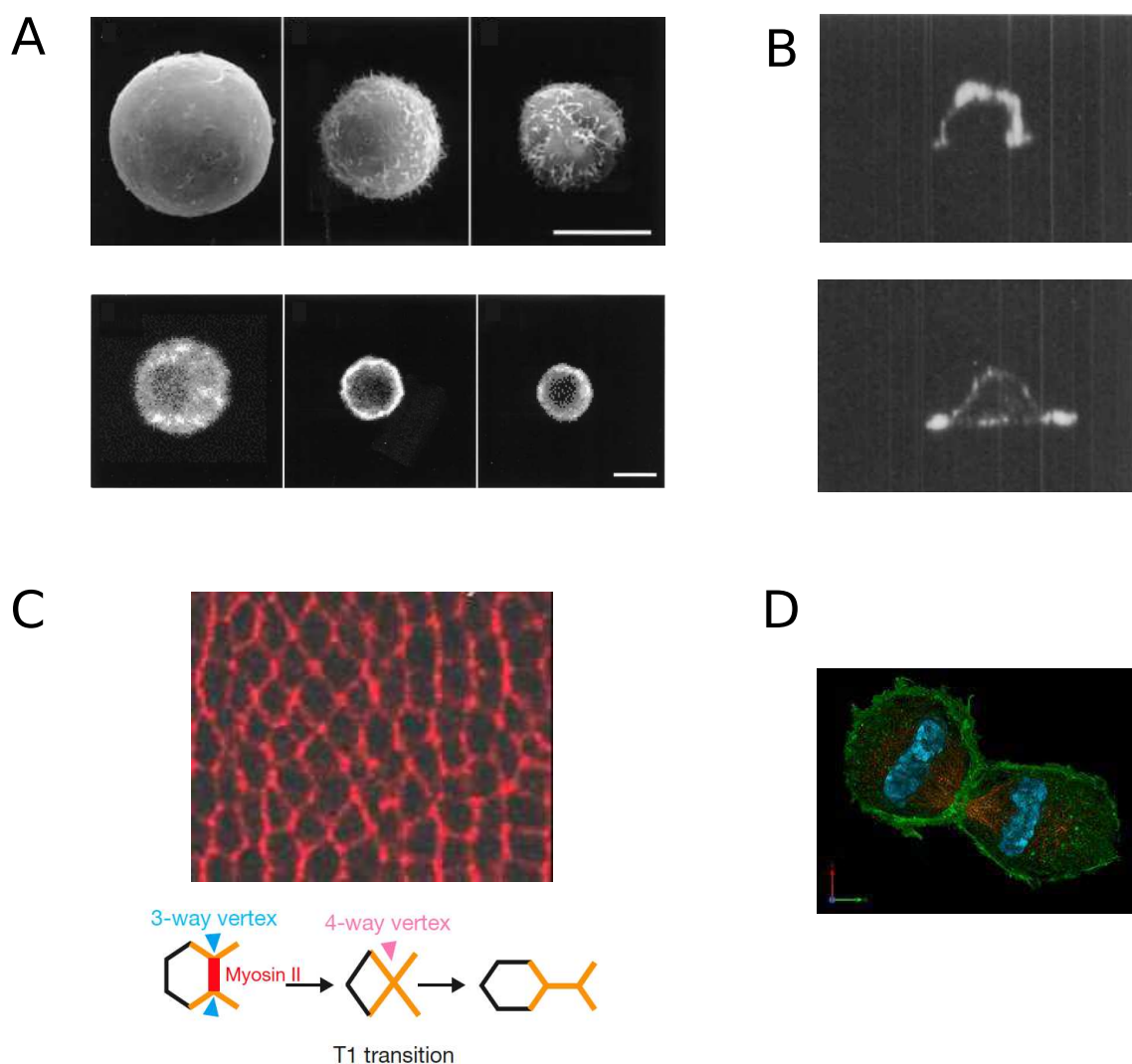


FIGURE 1.4 – A- Evolution de l'apparence de la membrane plasmique (microscopie électronique) et du cortex d'acto-myosine (microscopie confocale) en fonction de la pression osmotique du milieu extérieur, d'après [Guilak *et al.*, 2002]. A gauche, milieu hypo-osmotique. Au centre, milieu iso-osmotique. A droite, milieu hyper-osmotique. Echelle : 10 μm . B- Images en microscopie confocale de cellules en étalement. Les cellules sont fixées et l'actine est marquée à la phalloïdine [Bereiter-Hahn *et al.*, 1990]. C- Image en microscopie confocale montrant la répartition de la myosine II dans les cellules d'un embryon de drosophile. Le schéma illustre le changement de forme des cellules orienté dans la direction de l'allongement du tissu et corrélé à un enrichissement en myosine II à la jonction entre cellules. D- Image en microscopie à super-résolution d'une cellule en mitose. L'actine est en vert, le noyau en bleu, les microtubules en orange. (Issu de la page web de Lothar Schermelleh <http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=882>)

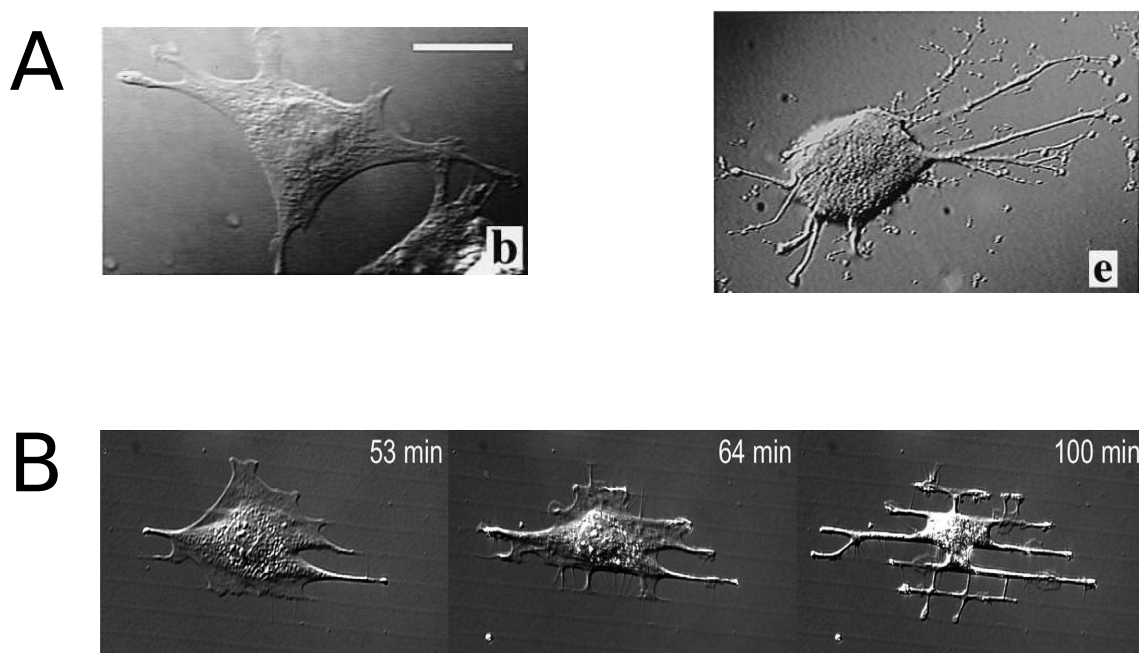


FIGURE 1.5 – A- Images en lumière blanche de cellules droguées à la latrunculine A (à gauche $0,6\mu\text{M}$, à droite $10\mu\text{M}$) [Bar-Ziv *et al.* , 1999]. B- Images en microscopie RIC d'une cellule placée sur un réseau de lignes parallèles. Evolution de la forme cellulaire après l'ajout de blebbistatine [Rossier *et al.* , 2010].

l'extérieur de la cellule, ce qui est problématique si on veut l'associer à une tension de surface effective.

Ces observations nécessitent en fait de faire appel à un autre acteur : il s'agit des complexes d'adhésion. Nous verrons en effet dans la prochaine section que seule une régulation fine des actions conjuguées de la membrane plasmique, du cortex d'actomyosine et des complexes d'adhésion peut donner naissance à la diversité des formes cellulaires.

Diversité des formes cellulaires

Car les cellules peuvent prendre des formes très diverses, bien plus diverses que celles prises par une simple goutte.

Un neurone possède par exemple de nombreuses dendrites dont une est plus longue (l'axone) et terminée par un bout de cytoplasme ; les cellules musculaires sont quant à elles très allongées dans la direction où s'opère leur contraction, tandis que les cellules épithéliales possèdent une face basale et une face apicale bien différenciées, l'une étant orientée vers l'intérieur de l'organisme l'autre vers l'extérieur⁵ (Fig 1.6-A).

De même, des cellules de types différents réalisant une même opération dans un même environnement peuvent prendre des formes très différentes. C'est le cas par exemple des fibroblastes et des kératocytes en migration, les uns étant allongés dans

5. On remarque au passage que l'architecture est fortement liée à la fonction de ces cellules : transport de l'information nerveuse dans un sens privilégié pour les neurones, frontière entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme pour les cellules de la peau. La question de savoir comment les cellules acquièrent une forme est donc de nature directement biologique.

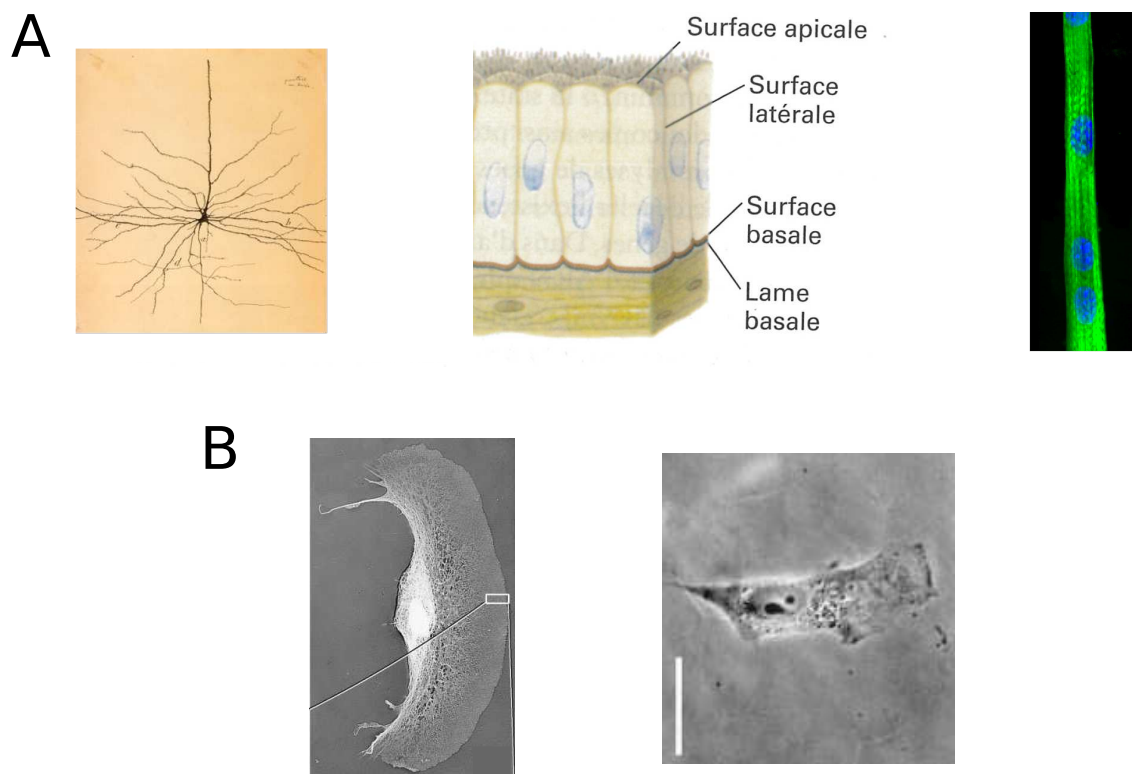


FIGURE 1.6 – A- Diversité des formes selon le type cellulaire. A gauche, dessin d'un neurone, par Santiago Ramon y Cajal. Au centre, schéma d'un tissu de cellules épithéliales [Lodish *et al.* , 1995]. A droite, image en microscopie de fluorescence montrant l'architecture d'un myotube ; l'actine est en vert, le noyau en bleu [Engler *et al.* , 2004b]. B- Diversité des formes chez différentes cellules en migration. A gauche, un kératocyte, issu de [Pollard & Borisy, 2003]. A droite, une cellule reinale [Pelham & Wang, 1997]. Dans les deux cas, la cellule avance vers la droite de la page.

le sens de migration et avançant lentement, les autres étant allongés dans la direction perpendiculaire et avançant beaucoup plus rapidement (Fig 1.6-B).

Par conséquent, le schéma formel évoqué plus haut utilisant la notion de tension superficielle comme gouvernant les formes cellulaires sera certes intéressant mais nécessitera d'être nettement complexifié.

1.2 Un matériau mou en équilibre dynamique dans un matériau mou en équilibre dynamique

1.2.1 Mécanique de l'intérieur

Nos questionnements à propos de la forme des cellules étaient certes quelque peu prématurés mais ils nous ont permis d'identifier des acteurs biologiques prépondérants pour la mécanique cellulaire. En effet, nous verrons tout au long de ce manuscrit que tous les phénomènes où la mécanique intervient ostensiblement dans la vie de la cellule - mitose, étalement, migration, polarisation (qui peut être de différents types) et modifications des propriétés rhéologiques (rigidification, fluidification) - ont pour point commun d'être au moins en partie gouvernés par les acteurs suivants :

- le cytosquelette d'actine qui peut s'associer de diverses manières avec les moteurs moléculaires (notamment la myosine II),
- les complexes d'adhésions qui fixent la forme créée par l'actine et transmettent au substrat les forces tensiles dues à la myosine,
- et bien sûr la membrane plasmique qui est forcément connectée aux deux premiers puisqu'elle définit la frontière de la cellule.

Nous allons maintenant décrire ces trois acteurs dans le détail en commençant par la membrane plasmique.

La membrane plasmique

La membrane plasmique décrit la frontière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Elle est faite d'une bi-couche lipidique et de protéines transmembranaires.

Les lipides sont de différents types (phospholipides, glycolipides, cholestérol), mais possèdent tous une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Les têtes hydrophiles sont tournés vers le cytoplasme ou l'extérieur tandis que les queues hydrophobes se font face à l'intérieur de la bi-couche ; c'est ce qui permet la formation d'un compartiment.⁶

Les protéines transmembranaires ont des rôles divers. Certaines sont des récepteurs des facteurs de croissance, d'autres sont responsables de l'adhésion avec l'extérieur et font le lien avec le cytosquelette (nous nous attarderons sur ces protéines dans quelques lignes), d'autres encore permettent le transport de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, soit en formant des canaux ioniques, soit en promouvant l'endocytose ou l'exocytose. Ainsi cette membrane, comme toutes les frontières, est loin d'être imperméable.

Par ailleurs, d'un point de vue mécanique, la membrane plasmique est un fluide ; elle est donc très déformable dans la direction perpendiculaire au plan de la membrane, mais incompressible et indilatable dans le sens parallèle (liquide 2D). Cette donnée pourra avoir de l'importance pour nous par la suite.

L'actine et la myosine, forment et déforment

L'actine est une protéine prédominante dans l'ensemble du monde vivant. En effet, elle est très abondante chez tous les eucaryotes, plantes et animaux y compris, où

6. Ce même procédé est utilisé pour créer des compartiments à l'intérieur de la cellule qu'on appelle les organites, le noyau en est un exemple.

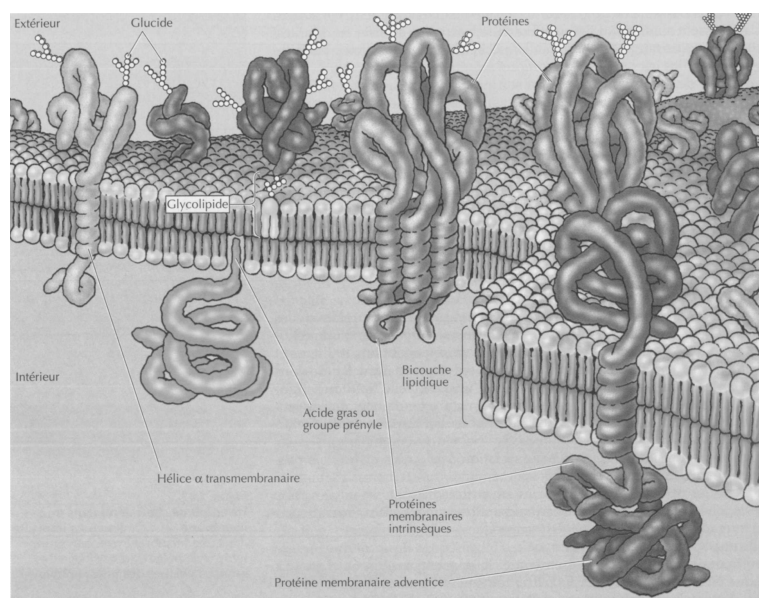


FIGURE 1.7 – Schéma illustrant la structure et la composition de la membrane plasmique [Cooper & Hausman, 2000].

elle représente 5 à 10% des protéines présentes dans les cellules [Lodish *et al.*, 1995]. On trouve même son homologue chez les bactéries (MreB) où elle joue aussi un rôle dans la création de la forme en orientant la construction de la paroi [Figge *et al.*, 2004].

L'actine s'organise en polymères qui prennent la forme d'une double-hélice.⁷ Après une étape de nucléation puis d'élongation, les filaments atteignent un état d'équilibre durant lequel ils polymérisent à un bout (*barbed end* en anglais ou *bout (+)*) en se liant à l'ATP et dépolymérisent spontanément à l'autre bout (*bout (-)*) après hydrolyse de l'ATP en ADP (Fig 1.8) [Pollard & Borisy, 2003]. Les filaments formés sont fins (7nm de diamètre) relativement à leur longueur qui peut souvent atteindre plusieurs micromètres. Leur longueur de persistance est de $17\mu\text{m}$ soit environ la taille d'une cellule, ce qui signifie que si les filaments se courbent dans nos problèmes, cette courbure sera ressentie dans l'intégralité du filament.

L'organisation et l'assemblage de l'actine sont gouvernés par l'affinité des monomères ou des filaments envers différentes protéines que l'on nomme en anglais *actin-binding proteins*. Ces protéines peuvent promouvoir la polymérisation de l'actine, servir de liens entre les filaments (cross-linkers), casser ces filaments, etc.

D'autre part, l'actine peut accueillir des moteurs moléculaires, qui appartiennent à la famille des myosines, lesquels peuvent se lier et se déplacer le long des filaments ou encore faire glisser ces filaments en se liant à deux d'entre eux.

Nous allons voir dans les prochains paragraphes que ces partenaires confèrent à

7. En fait, le monomère d'actine est souvent désigné par le nom d'actine globulaire (ou G-actine) tandis que l'actine organisée en polymère est nommée actine filamenteuse (ou F-actine). Par la suite, nous parlerons d'actine invariablement pour désigner l'actine isolée ou les filaments d'actine, même s'il s'agira le plus souvent de filaments d'actine. Nous faisons confiance au lecteur pour s'adapter selon les cas.

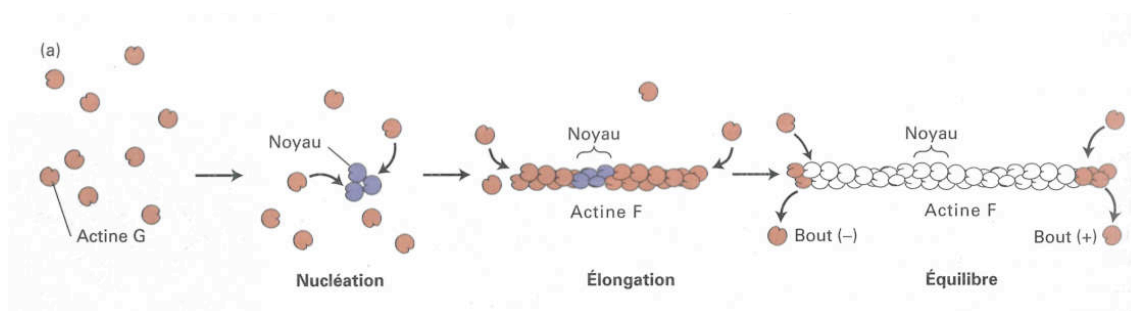


FIGURE 1.8 – Etapes de la croissance des filaments d'actine [Lodish *et al.* , 1995].

l'actine deux tendances contradictoires : une tendance protrusive qui favorisera les mouvements d'extension via différents appendices cellulaires (filopodes, lamellipodes) et une tendance contractile qui favorisera les mouvements de contraction. La résultante de ces deux tendances va donner naissance aux diverses formes et mouvements de la cellule.

Tendance protrusive Des études *in vitro* ont démontré qu'un mouvement spontané pouvait émerger de la polymérisation de l'actine lorsqu'elle est mise en solution avec quatre autres protéines ; il s'agit d'ARP 2/3, de la profiline, l'ADF/cofiline et de la *capping protein* [Loisel *et al.* , 1999]. Le scénario généralement admis pour décrire ce phénomène est le suivant. L'ATP-actine nucléée à partir d'ARP2/3, qui se fixe à un filament existant et oriente la poussée du nouveau filament en faisant un angle de 70° avec le premier. Le filament grandit ainsi jusqu'à ce qu'une *capping protein* se fixe à son extrémité et empêche la polymérisation. Ensuite, le filament vieillit, l'ATP-actine s'hydrolyse en ADP-actine, et dépolymérise grâce à l'intervention de l'ADF/cofiline. Enfin, la profiline transforme l'ADP libéré en ATP pour permettre un nouveau cycle (Fig 1.9-A).

Au sein des cellules, ce système forme une feuillet auto-organisé d'épaisseur allant de 0,1 à 0,5 microns et s'étendant sur 1 à 10 microns (voir image de microscopie électronique Fig 1.9). On nomme cette structure *lamellipode*. L'actine polymérisant préférentiellement contre la membrane dans le lamellipode, une partie de l'énergie dépensée permettra alors l'avancée de la protrusion, tandis qu'une autre partie poussera le filament en arrière dans un mouvement que l'on appelle *flux rétrograde*. Ce processus permettra ainsi l'extension de la membrane qui est la première chose nécessaire à la migration ou à l'étalement des cellules.

Cependant, si l'actine pousse contre la membrane, il est légitime de se demander comment a lieu l'insertion d'un nouveau monomère. Un des modèles les plus convaincants pour décrire ce phénomène est appelé *elastic Brownian Ratchet* [Mogilner & Oster, 2003]. Dans ce modèle, les auteurs prennent en compte la courbure des filaments d'actine sous l'effet des fluctuations thermiques, cette courbure temporaire laisserait assez d'espace entre le filament et la membrane pour l'insertion d'un monomère d'actine libre.

Mais le lamellipode n'est pas la seule structure protrusive existante chez les cellules animales. Une autre structure importante est appelée *filopode* ; c'est une fine protrusion cylindrique d'épaisseur et de longueur similaire à celle du lamellipode mais où la polymérisation des filaments d'actine est initiée par une protéine de la famille des formines

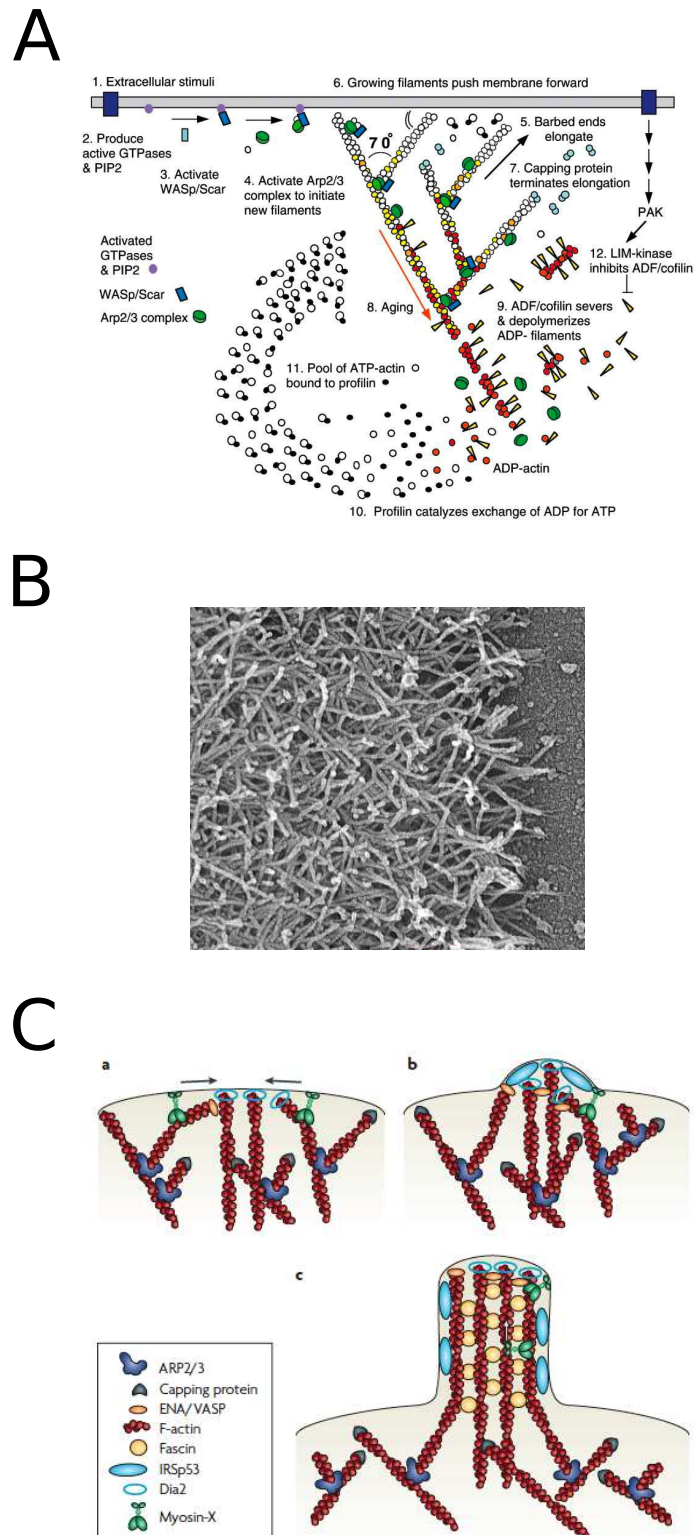


FIGURE 1.9 – A- Modèle de l'activité protrusive de l'actine telle qu'observée dans les lamellipodes [Pollard & Borisy, 2003]. B- Image en microscopie électronique du front avant d'un lamellipode [Pollard & Borisy, 2003]. C- Modèle de polymérisation de l'actine en place dans les filopodes [Mattila & Lappalainen, 2008].

(Dia2). Ce nucléateur permet un allongement non-branché des filaments, qui sont ensuite alignés et maintenus cohésifs dans la direction de la protrusion par la fascine, ce qui produit cette forme en faisceau (Fig 1.9-C).

On peut alors se demander comment la cellule choisit le type de protrusion qu'elle va adopter. En fait, les deux types de protrusions existent simultanément chez beaucoup de cellules, les filopodes se formant même très souvent au bout d'un lamellipode. Mais la structure choisie semble dépendante de la composition locale en capping proteins et anti-capping proteins (Ena/VASP) [Mejillano *et al.*, 2004].

Tendance contractile Comme nous le disions plus haut, l'actine peut se lier à des moteurs moléculaires du nom de myosines. Ces myosines ont de nombreuses isoformes chez les eucaryotes et forment une super-famille d'au moins 18 types. Néanmoins, nous nous intéresserons ici uniquement aux myosines II. Bien que découvertes et rendues célèbres pour leur rôle dans la contraction des muscles striés, ces moteurs sont en fait responsables de l'activité contractile dans toutes les cellules en se liant aux filaments d'actine.⁸

Ces contractions proviennent de la structure de la myosine qui progresse le long des filaments d'actine grâce à une queue et deux têtes. Ainsi, au début d'un cycle, les têtes sont fortement liées à l'actine ; les myosines jouent alors un rôle de cross-linker entre les filaments si elles sont liées à des filaments différents. Mais ces têtes peuvent être libérées par l'intervention de molécules d'ATP, qui en s'hydrolysant en ADP, vont permettre l'avancée le long du filament (Fig 1.10). Ainsi, en se liant à deux filaments différents simultanément, les myosines peuvent les faire glisser l'un par rapport à l'autre de manière anti-parallèle. De plus, si ces filaments sont fixés par ailleurs, ces mouvements peuvent faire apparaître des tensions dans le réseau lorsque celui-ci est désorganisé.

Cette double tendance d'attachement⁹ et de contraction provoque l'émergence de structures auto-organisées : le cortex d'acto-myosine et les fibres de stress.

Nous avons déjà évoqué plus haut le cortex d'acto-myosine. C'est une coque d'environ 1 micron d'épaisseur qui entoure le cytoplasme. Pourquoi est-il disposé à cet endroit ? Peut-être est-ce à cause des nucléateurs de la polymérisation de l'actine qui se situent proches de la membrane. En tout cas, ce cortex est particulièrement présent dans les cellules peu ou pas du tout étalées.

En revanche, il est plus difficile de le distinguer dans les cellules étalées sur un substrat 2D. Ici, les structures d'acto-myosine prédominantes sont les fibres de stress. Ces fibres, dont on comprend encore mal la formation, sont des faisceaux ordonnés composés d'actine, de myosine et de cross-linkers de l'actine. Elles peuvent mesurer plusieurs microns de longueurs et traversent souvent la cellule de part en part en se terminant par des complexes d'adhésion. En ces points, il est possible d'observer la transmission de forces au substrat, signes de l'activité contractile de ces fibres (Fig 1.11-A).

Ces fibres sont souvent ventrales, c'est-à-dire qu'elles sont disposées sous le noyau, proche du substrat lorsque la cellule est étalée sur un substrat plan. Cependant, de

8. Par la suite, le mot myosine désignera donc seulement les myosines II.

9. Notons au passage, que la myosine n'est pas le seul cross-linker de l'actine ; il existe par exemple, l'alpha-actinine qui joue également ce rôle.

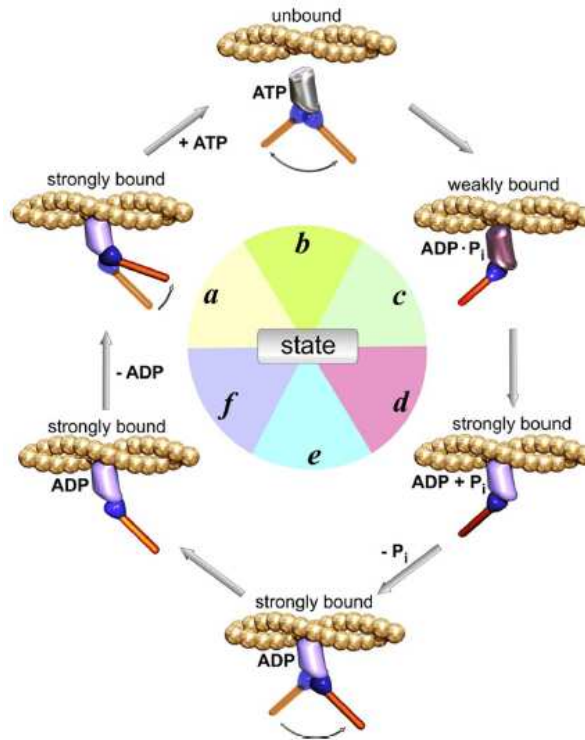


FIGURE 1.10 – Cycle de l'ATP générant l'avancée d'une tête de myosine le long d'un filament d'actine [Fitts, 2008].

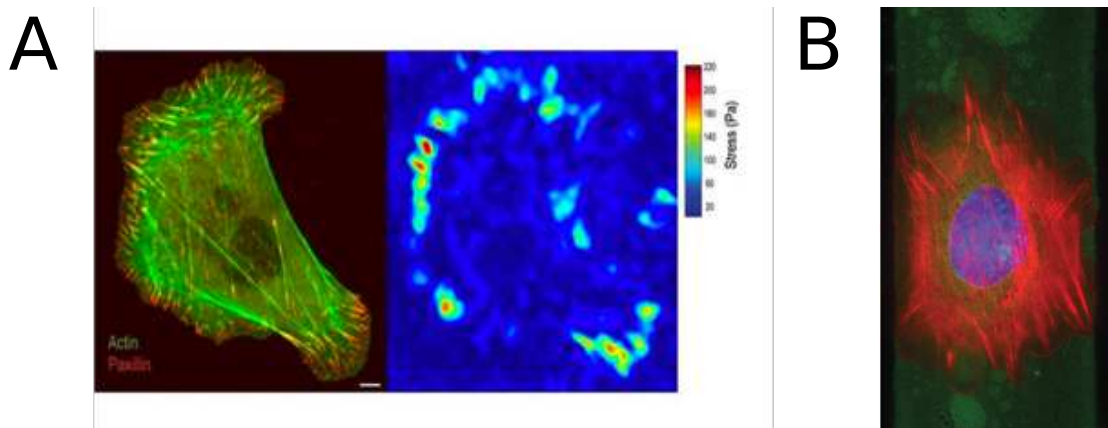


FIGURE 1.11 – A- A gauche, cellule étalée sur un substrat déformable, l'actine est marquée en vert et la paxilline en rouge. A droite, champ des contraintes mesurées dans le gel (source : site web du laboratoire de Margaret Gardel - <http://squishycell.uchicago.edu>). B- Chapeau d'actine (en rouge) visualisée au-dessus d'un noyau de fibroblaste (en bleu) [Khatau *et al.* , 2009].

pareilles fibres ont été récemment observées au-dessus du noyau [Khatau *et al.* , 2009], et sont même soupçonnées de pouvoir le déformer (Fig 1.11-B).

Microtubules et filaments intermédiaires

Nous avons jusqu'ici mis l'accent sur l'acto-myosine et son rôle en mécanique cellulaire. Toutefois, bien que nous nous y intéresserons assez peu par la suite, nous ne pouvons pas négliger l'importance pour nos préoccupations des autres filaments composant le cytosquelette : les microtubules et les filaments intermédiaires.

Microtubules Les microtubules résultent de la polymérisation d'une protéine : la tubuline, qui existe sous deux formes dans ces filaments l' α - et la β -tubuline. Ils s'organisent en tube de 25nm de diamètre (Fig 1.12-A), ce qui leur confère une longueur de persistance de plusieurs millimètres et un module élastique 300 fois supérieur à celui des filaments d'actine¹⁰. Cette propriété pourrait faire d'eux un des acteurs importants pour les propriétés mécaniques des cellules.

Les microtubules polymérisent lentement à partir d'un centre de nucléation, le centrosome, souvent situé à proximité du noyau puis dépolymérisent violemment par un phénomène dit de catastrophe se produisant à l'avant du filament. Ainsi, la taille des microtubules fluctue entre 1 et 10 μm . Par ailleurs, cette disposition en étoile du réseau permet aux moteurs moléculaires s'attachant aux microtubules (kinésines, dynéines) de transporter des protéines ou des organelles sur de grandes distances à travers les cellules.

Enfin, les microtubules semblent jouer un rôle clé dans tous les phénomènes de polarisation, événements où la mécanique joue une grande part. Par exemple, ils interviennent dans la polarisation des cellules ciliées où ils sont le constituant principal qui donne sa forme au cil [Satir & Christensen, 2007] mais aussi dans la polarisation des cellules motiles [Kaverina *et al.* , 2000], et bien sûr ils orientent la division et le transport du bagage génétique dans une direction et un sens privilégiés lors de la mitose.

Filaments intermédiaires Il existe cinq types de filaments intermédiaires (kératine, vimentine,...) s'exprimant chacun dans des types cellulaires différents. Cependant, les gènes codant pour ces protéines sont homologues, les filaments possèdent donc tous une structure semblable. Cette structure est fibrillaire ce qui rend les filaments intermédiaires plus stables que les autres composants du cytosquelette qui sont des polymères constitués d'entités globulaires (Fig 1.12-B). Autres conséquences de cette structure, aucun moteur moléculaire ne peut se greffer à eux et ils sont particulièrement difficiles à inactiver : contrairement aux autres filaments du cytosquelette pour lesquels on utilise des drogues inhibant la polymérisation, on doit avoir recours à des mutants pour limiter l'existence des filaments intermédiaires. On considère cependant qu'ils jouent un rôle mécanique important en renforçant la structure mécanique des cellules et des tissus [Goldman *et al.* , 1996] ; c'est le cas par exemple dans les muscles où la vimentine joint

10. Néanmoins, les microtubules sont souvent très courbés sur les images où ils apparaissent en microscopie de fluorescence, leurs propriétés mécaniques sont donc probablement plus complexes que celles d'un simple polymère.

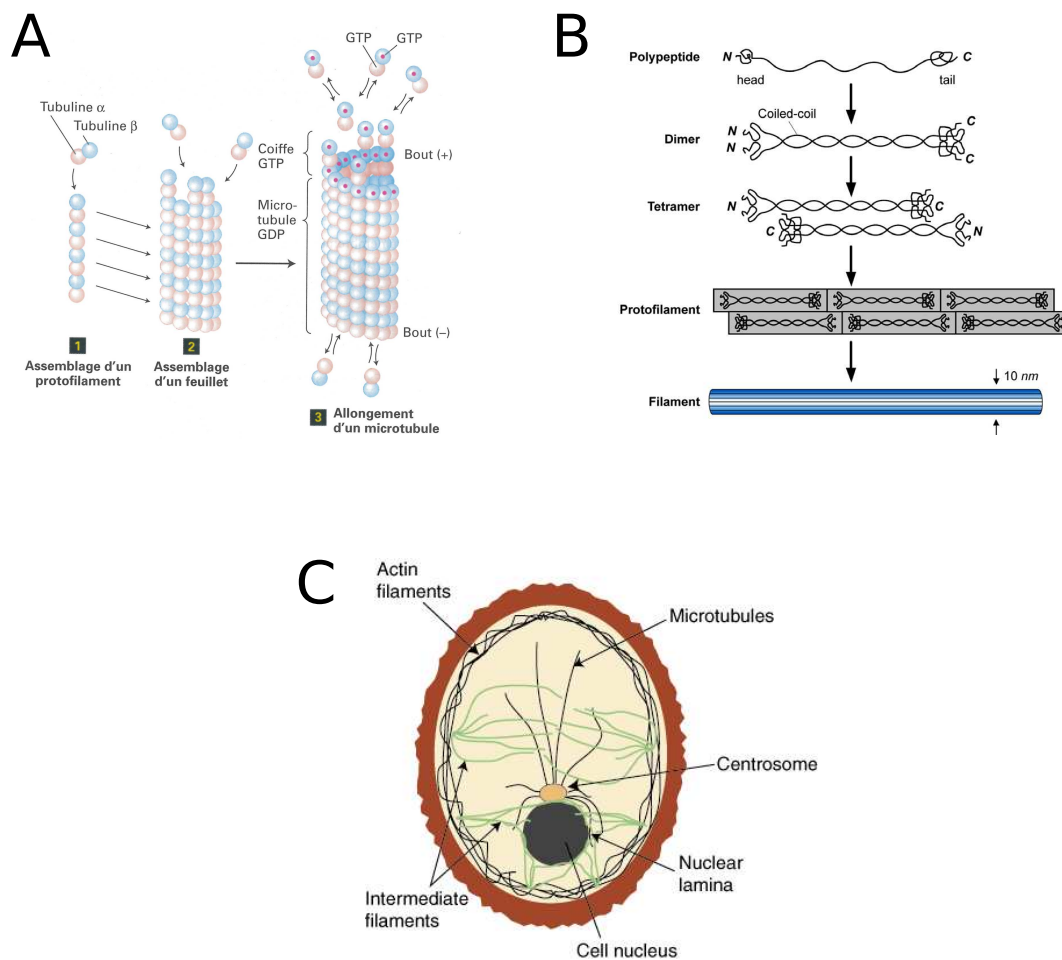


FIGURE 1.12 – A- Structure et formation des microtubules [Lodish *et al.*, 1995]. B- Structures des filaments intermédiaires [Suresh, 2007]. C- Schéma représentant les 3 types de filaments du cytosquelette au sein d'une cellule animale.

les fibres musculaires dans la direction perpendiculaire à leur contraction. Pour cela, leurs réseaux sont reliés entre eux à travers des jonctions que l'on nomme desmosomes.

Propriétés mécaniques des cellules isolées

Puisque nous cherchons à comprendre comment une cellule adopte une forme particulière et quel impact peut avoir l'environnement mécanique sur la vie de la cellule, une des premières choses à connaître est la manière dont elle se déforme sous l'effet d'une contrainte donnée. Or, étant données la taille et la composition cellulaire, il a fallu mettre au point des rhéomètres capables d'imposer ou mesurer des déformations de l'ordre du micron et des forces de quelques nano-newtons.

En fait, ce n'est qu'au début des années 2000 que ces mesures purent être réalisées rigoureusement. Pour cela, les chercheurs employèrent différentes techniques qui permirent de sonder la cellule localement à l'aide d'une bille posée à sa surface (pinces magnétiques, pinces optiques) ou d'une pointe (AFM), ou globalement en l'étirant de manière contrôlée (microplaques de verre - Fig 1.13-A). De cette manière, plusieurs équipes mirent en évidence une loi de comportement universelle de la rhéologie de la

cellule, indépendante du type cellulaire. Ainsi, les modules élastiques et visqueux, de même que la fonction de fluage des cellules se comportent tous en loi de puissance de la fréquence (respectivement, du temps) avec un même exposant variant entre 0,1 et 0,3 [Fabry *et al.* , 2001; Desprat *et al.* , 2005; Balland *et al.* , 2006]. Quant à l'amplitude du module visco-élastique, elle varie généralement entre 100 et 1000 pascals.

De tels résultats en loi de puissance sont très courants en rhéologie des milieux complexes. En effet, ces systèmes, faits comme les cellules de structures empilées à différentes échelles - on parle de milieux vitreux mous - possèdent des temps de relaxation caractéristiques de toutes ces échelles. Aussi, il est possible que ce soit la structure de l'ensemble du cytoplasme qui procure à la cellule de telles propriétés. Néanmoins, plusieurs arguments vont en faveur d'un rôle prépondérant de l'acto-myosine dans ce comportement. Par exemple, le fait de retrouver des résultats identiques localement lorsque la bille est liée au cortex d'acto-myosine et globalement, tend à montrer que les propriétés globales sont l'effet de ce cortex. D'autre part, l'emploi de drogue inhibant ou sur-activant les myosines II (DBcAMP, histamine) ou dépolymérisant l'actine (cytochalasine D) modifient considérablement le module de G' et G'' et l'exposant de la loi de puissance [Fabry *et al.* , 2001] (Fig 1.13-B). Plus particulièrement, une augmentation de la tension dans le réseau d'acto-myosine produit une augmentation de la rigidité des cellules qui corrèle également à un accroissement de la tension transmise à l'environnement [Wang *et al.* , 2001].

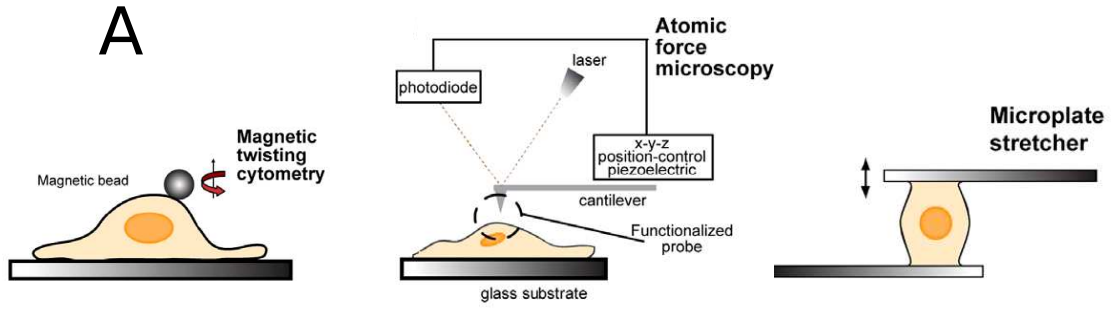
Cette tension communiquée à l'environnement est le synonyme d'un prestress, c'est-à-dire que la cellule s'est soumise à une contrainte d'elle-même, par l'intermédiaire de la tension acto-myosine, sans intervention extérieure. On peut alors se demander comment cette tension est transmise à l'environnement ; nous allons voir que cette fonction est remplie par des agrégats de protéines, dont certaines sont transmembranaires : les complexes d'adhésion.

Structure et dynamique des complexes d'adhésion

En 1983, des cellules furent mises pour la première fois en culture sur des substrats en silicone déformables à leur échelle [Harris *et al.* , 1980]. Les auteurs de cette étude remarquèrent l'existence de rides sur le substrat dont la présence était liée à l'activité contractile des cellules qu'ils modulèrent grâce à l'emploi de drogues. De plus, ils observèrent par microscopie interférentielle que la zone d'adhésion au substrat diminuait lorsque la contractilité était inhibée. Il existait donc un lien entre activité contractile cellulaire, aire d'adhésion et tension transférée au substrat.

En fait, cette zone d'adhésion avait déjà été observée dès les années 60 grâce à cette même technique de microscopie interférentielle, qui révéla alors des zones de jonction très fortes au bord de la cellule où membrane plasmique et substrat étaient séparés de seulement 100 Å [Curtis, 1964]. Il apparut plus tard que cette zone d'adhésion était en fait caractérisée par des points discrets de quelques micromètres carrés, que l'on nomma *contacts focaux* et qui terminaient de longs faisceaux d'actine [Izzard & Lochner, 1980].

Aujourd'hui, nos connaissances sur ces adhésions, leur composition et la manière dont elles sont liées au cytosquelette d'actine ont largement augmenté. On sait par exemple qu'il existe deux types de complexes adhésifs selon que le cytosquelette est lié à la matrice extra-cellulaire ou à une autre cellule (voir illustration Fig 1.14).



B

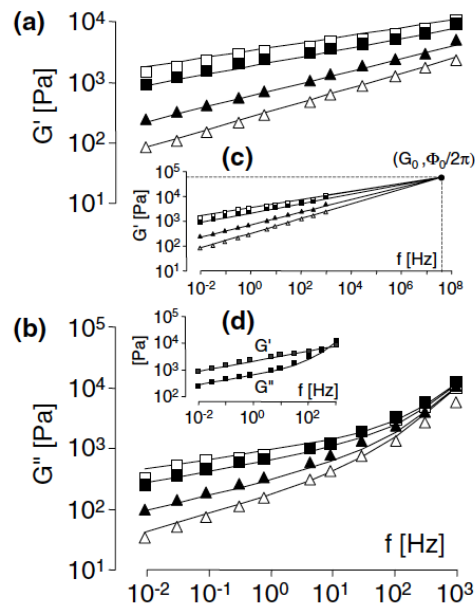


FIGURE 1.13 – A- Trois techniques servant à sonder les propriétés mécaniques de cellules isolées [Suresh, 2007]. B- Modules élastique (G') et visqueux (G'') de cellules de muscles lisses en fonction de la fréquence de sollicitation. Carré noir = contrôle, Carré blanc = 10 min après traitement à l’histamine (stimulant de la contractilité), Triangle noir = 10 min après traitement à la DBcAMP (réducteur de la contractilité), Triangle blanc = 10 min après traitement à la cytochalasine D (agent dépolymérisant l’actine) [Fabry *et al.*, 2001].

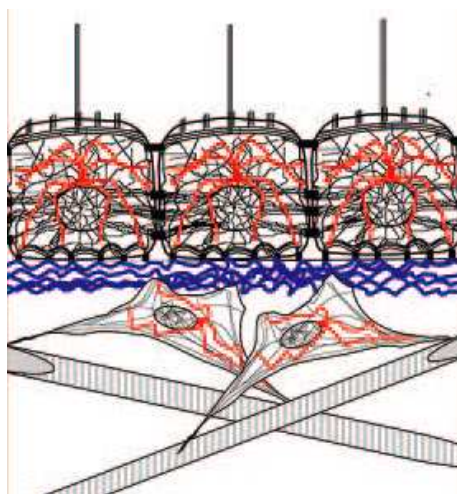


FIGURE 1.14 – Schéma de l'organisation du cytosquelette et des adhésions chez différentes cellules d'un tissu. La partie haute montre un tissu épithélial où les cellules adhèrent entre elles et à la matrice. Dessous, des fibroblastes sont tendus au sein d'un tissu matriciel.

Intéressons nous pour commencer aux adhésions à la matrice¹¹ - que l'on nommera génériquement *complexes d'adhésion* - car ce sont elles qui nous préoccupons majoritairement par la suite.

La protéine sur laquelle se fondent toutes les adhésions avec la matrice est l'intégrine. L'origine de l'intégrine est très ancienne, puisqu'il existe des homologues de cette protéine non seulement chez l'intégralité des métazoaires mais aussi chez certains champignons. Ainsi, son apparition date d'avant la séparation de ces deux groupes, ce qui souligne son importance pour l'évolution d'une grande partie du vivant [Sebé-Pedrós *et al.*, 2010].

L'intégrine est une protéine transmembranaire formée de 2 hétérodimères, les sous-unités *alpha* et *beta*, qui possèdent tous deux un domaine cytoplasmique et une queue extra-cellulaire. Il existe seize types de sous-unités *alpha* et huit types de sous-unité *beta*, la composition des deux créant une grande diversité d'intégrines [Clark & Brugge, 1995]. Cette diversité permet la connexion avec différentes protéines de la matrice (fibronectine, collagène, etc).

Entre l'intégrine et le cytosquelette, se trouvent un grand nombre de protéines dites adaptatrices. Parmi elles, la vinculine, la paxilline, la taline, la tensine ou encore la zyxine sont très souvent collocalisés avec l'intégrine et semblent prédominantes pour la transmission de la force et la signalisation partant des sites d'adhésion [Clark & Brugge, 1995; Zamir & Geiger, 2001; Kanchanawong *et al.*, 2010] (voir Fig 1.15). Elles peuvent donc être considérées comme des marqueurs cytoplasmiques des complexes d'adhésion¹².

Ces complexes d'adhésion peuvent prendre des tailles et des positions très variables. Comment ils naissent et grandissent sera une des questions au centre de cette thèse.

11. Nous présenterons les propriétés de cette matrice en détail dans le prochain paragraphe.

12. Toute notre étude présentée aux chapitres 2, 3 et 4 utilisera la paxilline comme marqueur de ces adhésions.

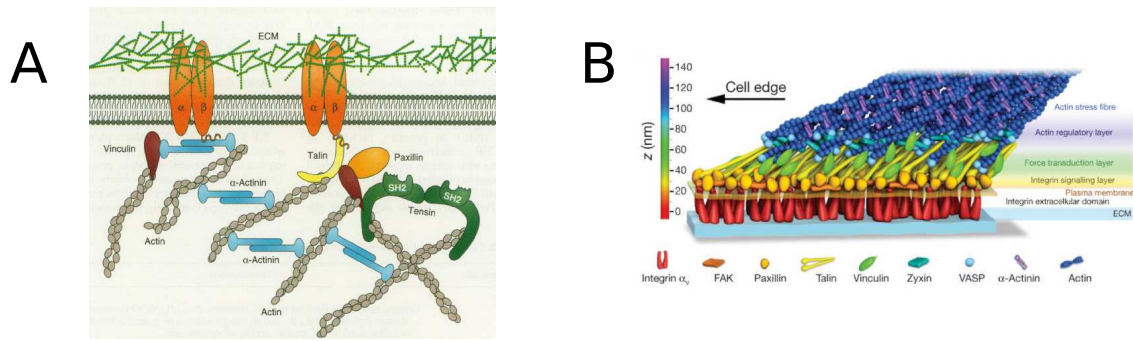


FIGURE 1.15 – Deux schémas montrant la structure des complexes d’adhésion. A- Schéma montrant les interactions entre protéines adaptatrices [Clark & Brugge, 1995]. B- Schéma montrant la position des protéines adaptatrices par rapport à la membrane [Kanchanawong *et al.*, 2010].

Cependant, et bien qu’il reste beaucoup à comprendre à ce sujet, nous savons que leur dynamique est largement le produit du caractère mécano-sensible de ces complexes [Wolfenson *et al.*, 2009]. Voici le scénario qui est aujourd’hui pressenti pour décrire leur formation.

En premier lieu, ils apparaissent sous la forme de points dont la surface vaut environ $0,1 \mu\text{m}^2$, situés à l’extrémité de la cellule dans le lamellipode. On parle alors d’*adhésion naissantes* ou *complexes focaux*. Alors, soit ces points disparaissent rapidement, soit ils croissent pour atteindre une taille typique de plusieurs microns carrés. On parle dans ce cas d’*adhésions focales* ou *contacts focaux*. Cette croissance est toujours orientée vers le centre de la cellule (direction et sens) et nécessite la présence de myosine II [Alexandrova *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008] (Fig 1.16-A)

En accord avec cette observation et corroborant les premières idées de [Harris *et al.*, 1980], [Balaban *et al.*, 2001] montrèrent que la taille de ces adhésions à l’état stationnaire est proportionnelle à la force transmise au substrat, avec un facteur de transmission de $5,5 \pm 2 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ (Fig 1.16-B). Cependant, cette idée est aujourd’hui remise en cause ; en effet, de nouvelles expériences tendent à montrer que tension et taille des adhésions sont proportionnelles seulement pendant la période de croissance et non à l’état stationnaire [Stricker *et al.*, 2011].

D’autre part, [Riveline *et al.*, 2001] démontrèrent que les complexes d’adhésion sont sensibles aux forces externes autant qu’aux forces internes. Pour cela, ils mirent en culture des fibroblastes dont ils inhibèrent la contractilité en retirant le sérum du milieu, puis ils appliquèrent une force centripète à l’une des extrémités de la cellule à l’aide d’une micropipette. Ils observèrent alors un recrutement de vinculine à l’endroit où la force fut appliquée (Fig 1.16-C). Cette remarque est très importante pour nous, car nous nous intéresserons par la suite à l’effet de l’environnement mécanique extérieure des cellules, qui est lui aussi susceptible de transmettre des forces comme nous le verrons dans le prochain paragraphe. Alors, il est possible qu’*in vivo* la croissance des sites d’adhésion, et plus généralement l’élaboration de l’architecture cellulaire, émerge de déformations suscitées par l’extérieur autant que par l’intérieur des cellules.

Mais revenons-en à la vie des complexes d’adhésion. Après cette phase de matura-

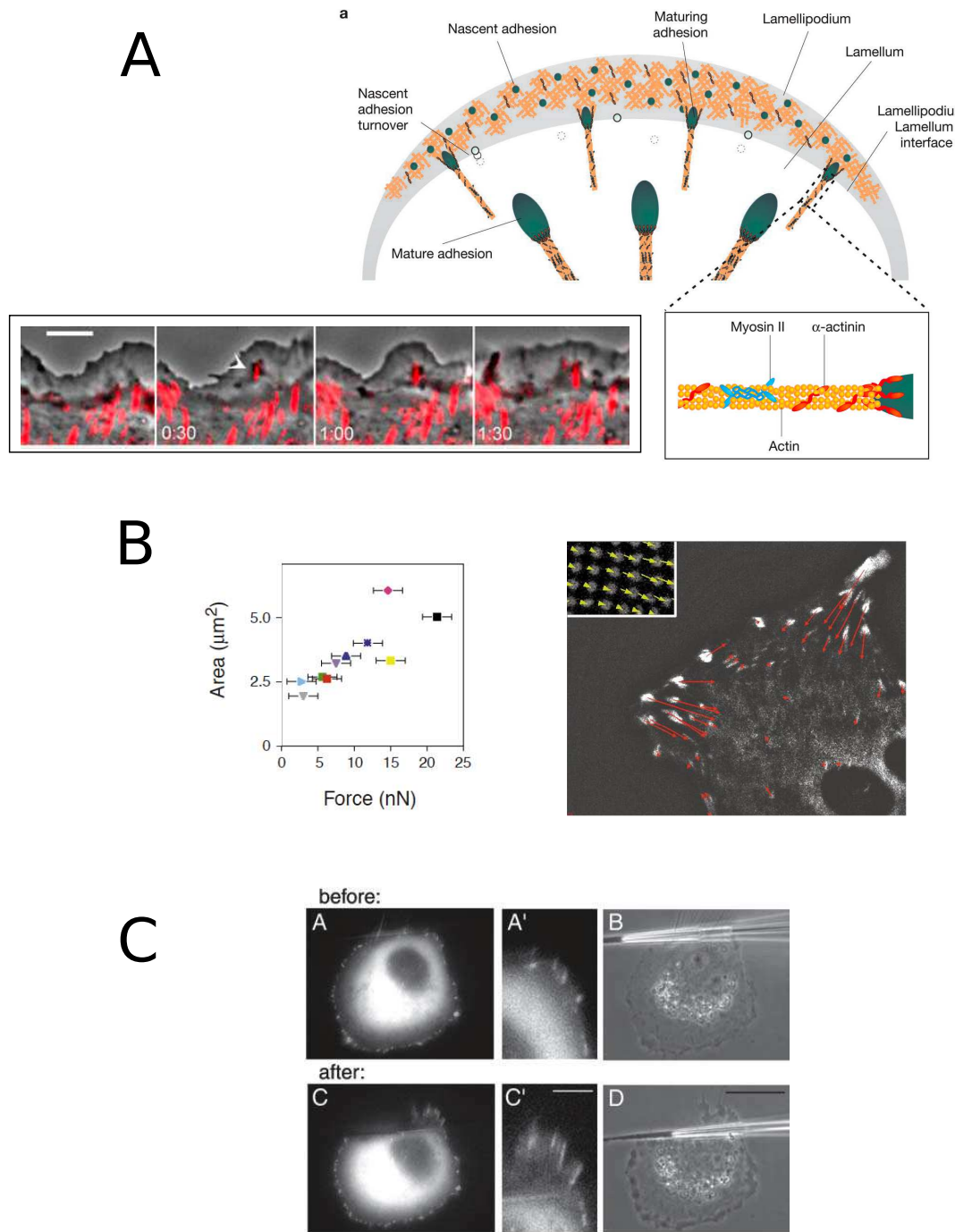


FIGURE 1.16 – A- Modèle de croissance des complexes d'adhésion [Choi *et al.* , 2008]. Encadré : croissance d'un complexe d'adhésion chez un fibroblaste Ref-52. Superposition d'une image de la cellule en lumière blanche et de la paxilline-YFP visualisée par TIRFM [Alexandrova *et al.* , 2008]. B- Graphe et image montrant la taille des complexes d'adhésion (ici représentés par la vinculine) en fonction de la force appliquée en ces points [Balaban *et al.* , 2001]. C- Croissance d'un complexe d'adhésion (ici représenté par la vinculine) sous l'effet d'une force appliquée au moyen d'une micropipette [Riveline *et al.* , 2001].

tion, les adhésions focales restent plusieurs minutes à l'état stationnaire avant finalement de se désagréger. On soupçonne que ce phénomène soit corrélé à un déplacement de la force. En effet, [Balaban *et al.* , 2001] montrèrent que l'ajout d'une drogue inhibant la contractilité cellulaire (le 2-3 Butanedione Monoxine ou BDM) provoque une rapide décroissance de la force aux points d'adhésion tandis que le nombre de protéines adaptatrices (ici représenté par l'intensité moyenne en vinculine-GFP) diminue proportionnellement à la force. Par ailleurs, ce temps de vie limité implique le perpétuel renouvellement des sites d'adhésion, même lorsque la cellule a atteint un état stationnaire (position et forme).

Pour finir, après plusieurs heures d'étalement, la cellule peut former des adhésions très allongées (jusqu'à $10\mu m$ de longueur) qui possèdent une position plus centrale dans la cellule [Zamir & Geiger, 2001] ; on parle alors d'*adhésion fibrillaires*.

A cette dynamique complexe des sites d'adhésion s'ajoute une dynamique toute aussi complexe de leurs composants. Ainsi, certains composants ne sont présents qu'à certains stades du développement des adhésions. Par exemple, la zyxine n'est pas présente dans les adhésions naissantes mais intervient dans les adhésions focales. De même, la tensine est présente dans les adhésions fibrillaires mais pas dans les adhésions focales [Zamir & Geiger, 2001].

En outre, l'arrivée de ces composants ainsi que leur temps de vie au sein des adhésions peut aussi varier. Ainsi, la paxilline et la *Focal Adhesion Kinase* (ou FAK, une kinase particulièrement impliquée dans la signalisation au niveau des adhésions) colocalisent avec l'intégrine quelques secondes après que celle-ci ait commencé à s'aggréger [Partridge & Marcantonio, 2006]. D'autre part, si la paxilline est renouvelée typiquement toutes les 15 secondes au sein d'une adhésion, ce temps peut être modulé d'un facteur 2 par la présence ou non de Shp 2 ou de FAK [Von Wichert *et al.* , 2003].

Rappelons enfin que les tissus, qu'ils soient faits de cellules et de matrices ou uniquement de cellules, sont cohésifs. Ceci indique que la tension intracellulaire est transmise vers l'extérieur quel que soit l'environnement. Il est donc bon de s'intéresser aussi aux adhésions entre cellules, que l'on nomme jonctions adhérentes, non pas pour en faire une revue détaillée, mais surtout pour souligner leurs points communs avec les complexes d'adhésion.

Ainsi, tout comme les complexes d'adhésion, les cellules adhèrent entre elles à partir de protéines transmembranaires qui sont reliées au cytosquelette d'actine par des protéines adaptatrices. La plupart de ces protéines sont différentes de celles impliquées dans l'adhésion avec la matrice ; c'est la famille des cadhérines par exemple qui sont les protéines transmembranaires, tandis que α -caténine et β -caténine sont les protéines adaptatrices majeures de ces complexes. Cependant, certaines protéines, par exemple la vinculine, se retrouvent dans les deux types d'adhésion, ce qui pourrait être à l'origine de mécanismes de régulation importants pour la physiologie des cellules [Pignatelli, 1998] ; on parle de *cross-talk*. De plus, autre point commun avec les complexes d'adhésion, le renforcement des jonctions adhérentes est contrôlé par la tension acto-myosine notamment à travers le recrutement de α -caténine et β -caténine [Yonemura *et al.* , 2010].

De tels points communs indiquent peut-être que l'évolution a utilisé des stratégies similaires pour conduire à l'émergence de ces deux types d'aggrégats. Plus pragmati-

quement, ils pourraient permettre d'étendre aux interactions cellules-cellules certains des résultats obtenus sur les adhésions avec la matrice, reste à savoir lesquels.

Protrusion d'actine, contractilité acto-myosine et croissance des adhésions, un système fermé

Une des données fondamentales qu'il faut retenir de cette section et sur laquelle nous voulons encore insister ici est donc ce lien très tenace qui existe entre contractilité acto-myosine et formation des complexes d'adhésion. Comme nous l'avons vu, la formation de ces assemblages supra-moléculaires est extrêmement interdépendante. Ainsi, les fibres de stress semblent naître à partir des complexes d'adhésion [Endlich *et al.* , 2007], tandis que les adhésions ne peuvent croître sans la présence de myosine [Alexandrova *et al.* , 2008; Choi *et al.* , 2008]. Et si l'on vient à couper une fibre de stress en son milieu, on observe un recrutement très rapide de protéines adaptatrices aux deux nouvelles extrémités du faisceau d'acto-myosine, ce qui a pour conséquence de redistribuer immédiatement la force contractile vers le substrat [Colombelli *et al.* , 2009]. Enfin, l'ajout d'un facteur soluble extérieur comme le sérum peut provoquer la formation conjuguée de ces deux types de structures, à travers l'activation de la protéine Rho par les facteurs de croissance qu'il contient [Ridley *et al.* , 1992a,b].

D'autre part, [Price *et al.* , 1998] ont montré que l'initiation d'un lien entre intégrine et fibronectine entraîne l'activation de voies de signalisation mettant notamment en jeu des protéines enzymatiques GTPase (Rac, Cdc42) qui conduisent à la formation de structures protrusives (filopodes, lamellipodes). Ainsi, la formation de liens adhésifs peut aussi être à la source de l'étalement cellulaire.

On s'aperçoit donc que les complexes d'adhésion jouent un rôle central dans les deux tendances contradictoires du réseau d'actine, d'une part en initiant la formation de structures contractiles, d'autre part en initiant la formation de structures protrusives. Il est donc très naturel de les retrouver à la connexion entre ces deux réseaux dans les deux sens du terme, réseau protéique de signalisation (Fig 1.17-A) et réseau physique de polymères. En effet, il a été démontré qu'à l'avant des cellules migrantes, il existe deux réseaux d'actine bien distincts : le lamellipode qui ne contient que de l'actine très dynamique, et la lamelle, organisée elle aussi en feuillet, mais qui contient en plus de la myosine ; et à la frontière entre ces deux compartiments correspond la zone où se forment les adhésions focales [Ponti *et al.* , 2004] (Fig 1.17-B).

Pour finir, insistons sur deux points qui nous semblent fondamentaux et sur leurs conséquences.

Premièrement, la cellule, même dans un état stationnaire, montre un très grand dynamisme. Ainsi, elle dépense énormément d'énergie dans la polymérisation de l'actine à son front, mais aussi énormément d'énergie pour maintenir en forme le corps cellulaire à travers la contraction des myosines. Or, le bilan de ces deux ardeurs *a priori* contradictoires est le plus souvent nul : hormis lors de la migration ou de l'étalement, les cellules sont dans un état stationnaire, maintenant leur forme et leur position.

Deuxièmement, il existe chez les cellules animales une interdépendance des complexes protrusifs, contractiles et adhésifs de la cellule qui fait d'eux un système fermé,

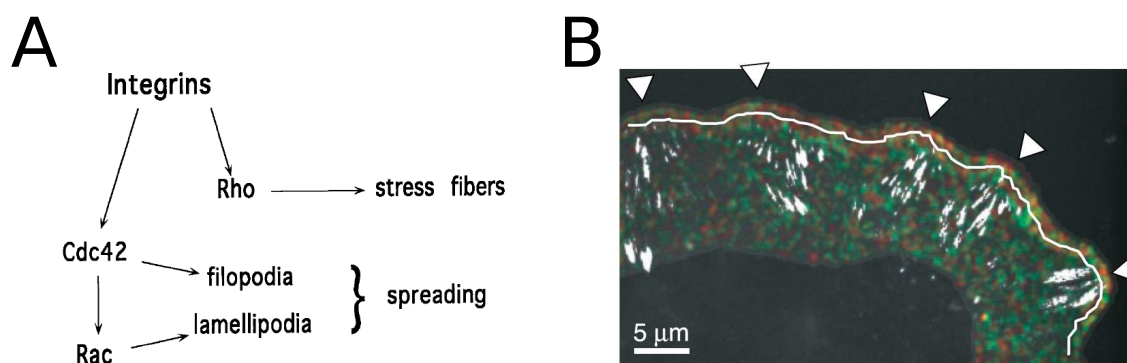


FIGURE 1.17 – A- Diagramme montrant l’activation par l’intégrine des GTPases contrôlant l’étalement et la formation des fibres de stress [Price *et al.* , 1998]. B- Image montrant la frontière entre le lamellipode et la lamelle ; les adhésions (en blanc) prennent place dans la lamelle où se trouve la myosine [Ponti *et al.* , 2004].

irréductible à ses parties - et, accessoirement, très difficile à étudier.

Sans faire preuve de finalisme, nous pouvons nous interroger sur l’utilité de détenir ces deux propriétés. Une hypothèse est que l’interdépendance de réseaux très dynamiques aux effets possiblement opposés permet une grande réactivité des cellules. En effet, de subtils déséquilibres et une régulation minutieuse d’un tel système aident sans doute la cellule à passer rapidement d’un état à un autre, provoquant ainsi la plupart des événements mécaniques recensés chez la cellule animale : étalement simple, étalement post-mitotique, polarisation, migration, etc.

La migration est un exemple particulièrement frappant d’une telle coordination entre tension et adhésion. Le scénario généralement admis pour décrire ce phénomène est le suivant : une protrusion du réseau d’actine permet une extension du corps cellulaire, cette extension est consolidée par la formation d’adhésions à l’avant, puis les structures contractiles d’acto-myosine imposent une contraction du corps cellulaire, ce qui permet le déplacement de son centre de gravité vers l’avant lorsque les adhésions à l’arrière de la cellule sont rompues (Fig 1.18) [Mitchison & Cramer, 1996]. Cependant, tous ces événements ont lieu simultanément dans la cellule et les détails des régulations permettant le mouvement dirigé restent largement incompris. L’étalement, dont nous parlerons abondamment dans les prochains chapitres, est en cela assez similaire à la migration.

1.2.2 Mécanique de l’extérieur

Après avoir décrit les caractéristiques mécaniques propres aux cellules animales isolées, intéressons-nous maintenant, toujours d’un point de vue mécanique, à l’environnement que côtoient ces cellules *in vivo*.

Les animaux sont les êtres vivants qui sont doués de sensibilité et de motilité, c’est de là que vient leur nom, c’est la définition qu’en donne le Petit Robert de la langue Française. Mais le Muséum d’Histoire Naturelle de Toulouse donne des animaux une autre définition. Il définit comme animaux les êtres vivants synthétisant du collagène. Or, le collagène est une protéine fibreuse qui forme un gel entourant les cellules qui en produisent et auquel elles adhèrent. Ainsi, il pourrait exister, chez les animaux, un lien

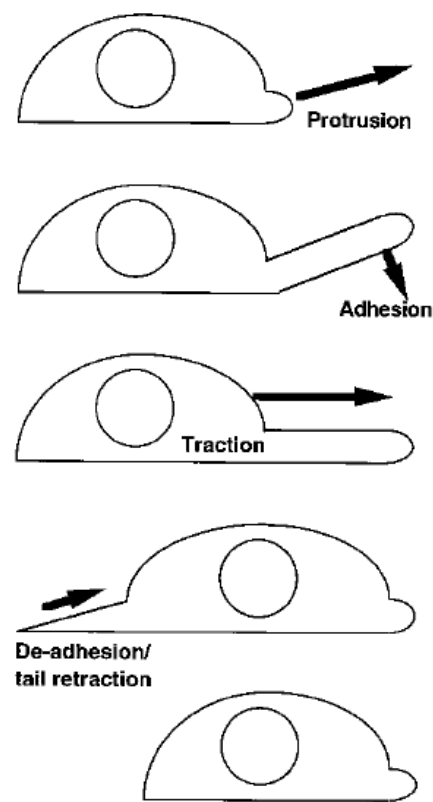


FIGURE 1.18 – Schéma de principe de la migration d'une cellule sur un substrat 2D [Mitchison & Cramer, 1996].

ontologique entre le fait de se mouvoir et le fait de produire une matrice extra-cellulaire.

A l'échelle inférieure, nous avons vu que la mécanique des cellules animales est gouvernée par une relation complexe entre force et adhésion à la matrice. Nous retrouvons donc au cœur de la définition des animaux, la relation centrale de la mécanique cellulaire.

Ceci dénote le fait que la mécanique pourrait être un facteur clé en vue d'intégrer les différents pans de la biologie animale (biologie cellulaire, biologie du développement, biologie de l'évolution).

Mais revenons aux questionnements qui nous intéressent dans ce manuscrit. Ces remarques sur le collagène et la motilité, ajouté au fait qu'une force appliquée à partir de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule peut avoir des conséquences similaires sur la croissance des adhésions et donc l'architecture cellulaire, doivent nous motiver pour décrire dans le détail l'environnement mécanique auquel sont confrontés les cellules *in vivo*.

Comme nous allons le voir, cet environnement peut être modulé via plusieurs paramètres : le confinement géométrique relié à la densité de cellules ou de matrice, la rigidité de la matrice ou des cellules elles-mêmes ou encore l'application de forces provenant des cellules environnantes ou de l'environnement global des tissus.

Confinement géométrique

Les cellules animales évoluent dans des environnement géométriques très divers, qui peuvent varier sur des échelles spatiales et temporelles très brèves.

Un premier exemple est celui de l'embryogenèse. On peut voir sur la figure 1.19-A les premières étapes du développement d'un embryon de xénope. On observe alors une chose très flagrante : le nombre de cellules, qui est de un au début du processus, passe à quelques milliers en quelques heures. C'est pourtant le même volume qui est occupé au début et à la fin par l'embryon, ce passage nécessite donc une compaction énorme des cellules filles, comparée à l'espace qu'occupait la toute première cellule mère.

Deuxièmement, les structures quelquefois complexes que prennent certains tissus *in vivo* contraignent les cellules qui les composent à prendre des formes très variables, y compris pour des cellules très proches les unes des autres. On voit par exemple sur la figure 1.19-B que la courbure du substrat sur lesquels reposent les cellules épithéliales peut rapidement être inversée (en passant de convexe à concave et inversement en quelques cellules) ; de plus, deux cellules superposées peuvent être allongées dans des directions perpendiculaires.

Enfin, les cellules circulantes, par exemple les cellules du système immunitaire, peuvent d'elles-mêmes passer d'un environnement non-confiné, lorsqu'elle circule dans les vaisseaux sanguins, à divers environnements confinés lorsqu'elles s'insèrent dans les tissus pour remplir leur fonction immunitaire. Suivant ce changement d'environnement, la cellule passe alors d'une forme ronde à une forme complexe allongée [Diacovo *et al.*, 1996].

Rigidité et composition des tissus biologiques

Les tissus biologiques sont composés de cellules et de matrice-extracellulaire. La matrice extra-cellulaire est un milieu aqueux et complexe, fait de polysaccharides (pro-

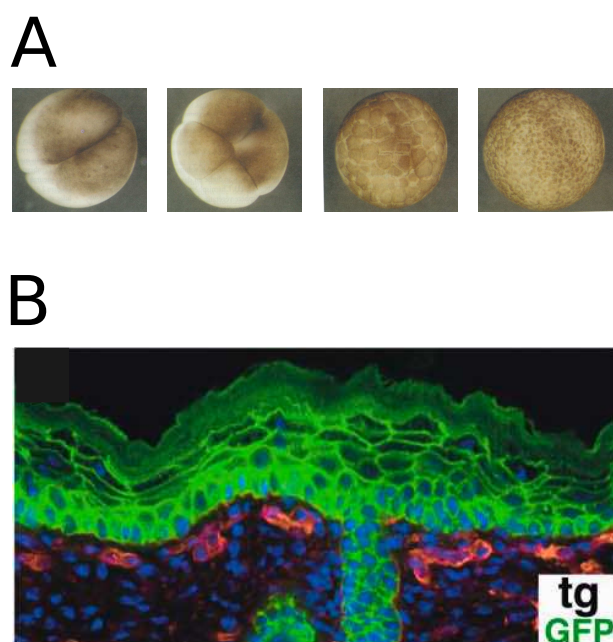


FIGURE 1.19 – A- Premières étapes du développement de l'oeuf de xénope, passant de 2 à plusieurs milliers de cellules. (D'après [Gilbert, 2004]) B- Vue en coupe d'un tissu épithélial ; l'actine est en vert, les noyaux sont en bleus [Vaezi *et al.* , 2002]

téoglycanes, acide hyaluronique) et de protéines fibreuses (collagène, élastine, fibronectine), que sécrètent les cellules [Lodish *et al.* , 1995].

Comme les cellules, la matrice extra-cellulaire est un matériau visco-élastique. Ainsi, une étude récente sur des solutions *in vitro* de collagène, de loin la protéine la plus abondante de la matrice, montre qu'aux grandes concentrations, les modules élastiques et visqueux se comportent en loi de puissance de la fréquence [Gobeaux *et al.* , 2010]. L'exposant de cette loi de puissance est d'ailleurs similaire à celui observé chez les cellules (0,15-0,30). Ce comportement, pareil à un milieu mou vitreux, pourrait donc être une propriété fondamentale du vivant.

Mais les différences de rigidités et plus généralement les propriétés mécaniques des tissus dépendent aussi de la teneur en chacun des composants de la matrice. Par exemple, l'élastine confère aux tissus où elle réside des propriétés élastiques importantes, tandis que les protéoglycanes, chargés négativement, rendent les tissus résistants aux contraintes de compression [Wang & Thampatty, 2006].

En outre, les propriétés mécaniques des tissus peuvent aussi être contrôlées par la structure et l'organisation de la matrice. On peut trouver un exemple particulièrement frappant de ces nuances dans l'organisation du cartilage articulaire, tissu important d'un point de vue mécanique pour l'organisme puisqu'il encaisse une grande part des contraintes (compression et cisaillement) liées aux mouvements des membres.

Comme le montre la figure 1.20-A, le cartilage articulaire est constitué de 4 couches de structures et compositions différentes [Wong & Carter, 2003] :

- dans la zone superficielle (0-100 μm), les fibres de collagène sont disposées parallèlement à la surface, et la concentration en protéoglycanes est faible comparée au reste du tissu ; par ailleurs, les chondrocytes (cellules du cartilage) sont alignés

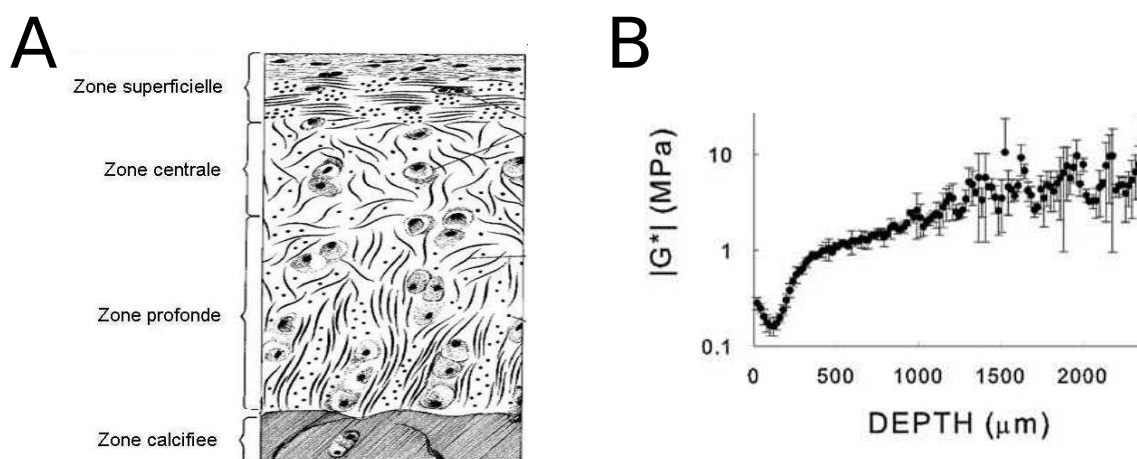


FIGURE 1.20 – A- Schéma montrant l'organisation du tissu dans les différentes zones du cartilage articulaire. B- Module visco-élastique du cartilage articulaire d'un genou de veau en fonction de la profondeur [Buckley *et al.* , 2010].

dans la direction des fibres de collagène.

- dans la zone centrale (100-500 μm), la concentration en protéoglycanes est au contraire plutôt grande tandis que le collagène est organisé de manière isotrope ; les chondrocytes ont aussi une forme plus ronde.
- dans la zone profonde (jusqu'à 2cm de profondeur), les fibres de collagène sont organisées perpendiculairement à la surface et les chondrocytes s'organisent en colonnes le long de cet axe.
- enfin, la zone calcifiée fait la transition entre le cartilage et l'os proprement dit.

Or, une étude détaillée des propriétés mécaniques du cartilage articulaire a mis en évidence des correspondances entre ces différentes zones et le module visco-élastique du tissu [Buckley *et al.* , 2010]. Ainsi, ce module est faible dans la zone superficielle et diminue avec la profondeur puis il augmente dans la zone centrale avant d'atteindre un plateau dans la zone profonde (Fig 1.20-B).

Toutes ces propriétés (structure, composition, organisation) mais aussi la présence ou non de cellules donnent naissance à des tissus de rigidités très variables, allant de la dizaine de pascals pour la graisse à plusieurs centaines de kilopascals pour le cartilage articulaire [Levental *et al.* , 2007]. Si on compare maintenant ces chiffres à la rigidité typique d'une cellule, qui est de quelques centaines de pascals, on se rend compte que les cellules peuvent s'adapter et vivre dans des milieux plus mous ou beaucoup plus durs qu'elles. D'autre part, cette rigidité semble être un facteur physiologique important pour les tissus. Ainsi, une glande mammaire normale possède une rigidité d'une centaine de pascals tandis qu'une tumeur cancéreuse au niveau de cet organe a une rigidité de plusieurs milliers de pascals [Levental *et al.* , 2007].

Enfin, les proportions et l'organisation des différents composants de la matrice influencent aussi la façon dont les cellules y adhèrent. En effet, d'une part ce sont des intégrines différentes qui se lient aux différentes protéines fibreuses (collagène et fibronectine, par exemple) ; d'autre part, augmenter la densité de la matrice est aussi synonyme d'une augmentation du nombre de ligands potentiels pour la cellule.

Tissue type	Animal	Testing method	Elastic modulus	Ref
Achilles' tendon	Rat	Tension	310 Mpa	15
Articular cartilage	Bovine	Compression	950 kPa	86
Skeletal muscle	Rat	Tension	100 kPa	87
Carotid artery	Mouse	Perfusion	90 kPa	88
Spinal cord	Human	Tension	89 kPa	89
Thyroid cancer ^a	Human	Compression	45 kPa	16
Spinal cord	Rat	Tension	27 kPa	90
Cardiac muscle	Mouse	Tension	20–150 kPa	91
Skeletal muscle	Mouse	AFM	12 kPa	13
Thyroid	Human	Compression	9 kPa	16
Lung	Guinea pig	Tension	5–6 kPa	5
Breast tumor	Human	Compression	4 kPa	7
Kidney	Swine	Rheology	2.5 kPa	92
Premalignant breast ^b	Human	Indentation	2.2 kPa	14
Fibrotic liver	Human	Compression	1.6 kPa	93
Liver	Human	Compression	640 Pa	93
Lymph containing metastases	Human	Vibrational resonance	330 Pa	17
Brain	Swine	Indentation	260–490 Pa	94
Lymph node	Human	Vibrational resonance	120 Pa	17
Mammary gland	Human	Compression	160 Pa	7
Fat	Human	Indentation	17 Pa	14

^a Thyroid papillary adenocarcinoma. ^b Mammary ductal carcinoma *in situ*.

FIGURE 1.21 – Tableau récapitulant les rigidités des différents tissus des animaux [Levental *et al.*, 2007].

Forces extérieures : tension, compression, cisaillement

Dans l'organisme, les cellules sont soumises à plusieurs types de contraintes extérieures (tension, compression, cisaillement) qui peuvent avoir des origines diverses.

Pour commencer, les animaux sont soumis en permanence à leur propre poids qui induit dans tout le corps des contraintes de compression. Mais ils sont aussi traversés de forces cycliques associées à certains rythmes vitaux comme la marche, la respiration et les battements cardiaques.

Ainsi, la marche crée des contraintes de compression qui sont encaissées au niveau des articulations par le cartilage ; la respiration soumet, chez les humains et beaucoup d'autres espèces, tout le tronc et en particulier les parois pulmonaires à des contraintes de cisaillement ; quant aux battements cardiaques, ils induisent une circulation rythmée du flux sanguin qui crée aussi des contraintes de cisaillement mais dans les vaisseaux sanguins cette fois.

On constate donc que c'est la quasi-intégralité des tissus et organes qui font face en permanence à ces forces cycliques. En outre, il est remarquable que l'interdépendance de tous ces rythmes - la marche nécessitant de l'oxygène transporté grâce aux battements cardiaques et collecté à travers la respiration - crée une même fréquence caractéristique pour tous. Cette fréquence est de l'ordre du hertz chez l'être humain, elle est plus grande chez la souris, plus petite chez l'éléphant.

Pour finir, un autre processus où les cellules sont soumises à des forces importantes est l'embryogenèse. Ici, les nombreuses mitoses et forces contractiles générées par les cellules provoquent d'énormes mouvements globaux - un exemple typique est la gastrulation - qui résultent en des changements de forme de l'organisme mais provoquent aussi de grandes déformations des cellules, résultats de tensions, compressions et cisaillements conjugués.

1.3 L'environnement mécanique influence la vie des cellules animales - Évidences expérimentales

Nous avons vu que la morphogénèse cellulaire est un phénomène impliquant l'action conjuguée de plusieurs acteurs, dont notamment le cytosquelette d'acto-myosine et les complexes d'adhésion. Nous avons aussi vu que ces complexes d'adhésion sont des structures mécano-sensibles à l'interface entre les structures contractiles d'acto-myosine et le milieu extérieur et qui s'adaptent non seulement aux tensions internes mais aussi aux forces externes. Enfin, nous avons vu que ce milieu extérieur pouvait être très divers d'un point de vue mécanique (contraintes diverses, rigidité,...) selon le tissu considéré.

Aussi, il n'est pas étonnant, comme nous allons voir dans cette section, que les complexes d'adhésion, et plus généralement toute l'architecture cellulaire, s'adaptent à cet environnement mécanique extérieur avec des types d'adaptations identiques selon que l'on varie tel ou tel paramètre mécanique. Cependant, nous verrons que des processus cellulaires complexes, comme la différenciation ou l'apoptose, peuvent également être guidés par l'environnement mécanique.

Il faut noter que ces découvertes ont été possibles grâce à des avancées sur le plan expérimental qui permirent de reproduire les environnements dans lesquels nichent les cellules *in vivo*. En effet, jusqu'à il y a peu et encore aujourd'hui, les expériences de biologie cellulaire ont été menées dans des environnements certes constants mais extrêmement différents de ceux décrits plus haut ; il s'agit de substrats plans en verre ou en plastique, donc extrêmement rigides comparés aux rigidités habituelles des tissus, et sur lesquels les cellules peuvent s'étaler sans contrainte.

1.3.1 Confinement géométrique

Afin de reproduire les états géométriques rencontrées par les cellules *in vivo*, une technique devenue aujourd'hui très classique est l'usage de motifs adhésifs de taille et de géométrie contrôlées.¹³

Cette technique a tout d'abord permis d'étudier l'effet du confinement sur l'architecture cellulaire. Ainsi, en cultivant des cellules endothéliales sur des substrats carrés de différentes tailles, [Chen *et al.* , 2003] remarquèrent que la quantité de vinculine et de tyrosines phosphorylées (signe d'une activité de signalisation) recrutées au niveau des adhésions focales augmente avec la taille du motif (Fig 1.22-A). Par ailleurs, l'actine chez ces mêmes cellules endothéliales s'organise majoritairement sous forme de fibres en périphérie sur des grands motifs, tandis qu'elle est plutôt diffuse sur de petits motifs, et de manière concomitante, le module élastique augmente avec l'aire de la cellule (Fig 1.22-B).

En cultivant des cellules de muscle lisse sur des substrats de piliers déformables par les cellules, [Tan *et al.* , 2003] ont de plus montré que la force transmise au substrat augmente avec l'aire d'étalement des cellules (Fig 1.22-C).

Cependant, la répartition des tensions au sein de la cellule est aussi gouvernée par la géométrie du motif adhésif. En effet, [Théry *et al.* , 2006] ont montré que l'organisation

13. Nous présentons un protocole de fabrication de ces motifs dans l'Annexe C de ce manuscrit, nous ne nous attarderons donc pas ici sur les différentes manières d'obtenir ces motifs.

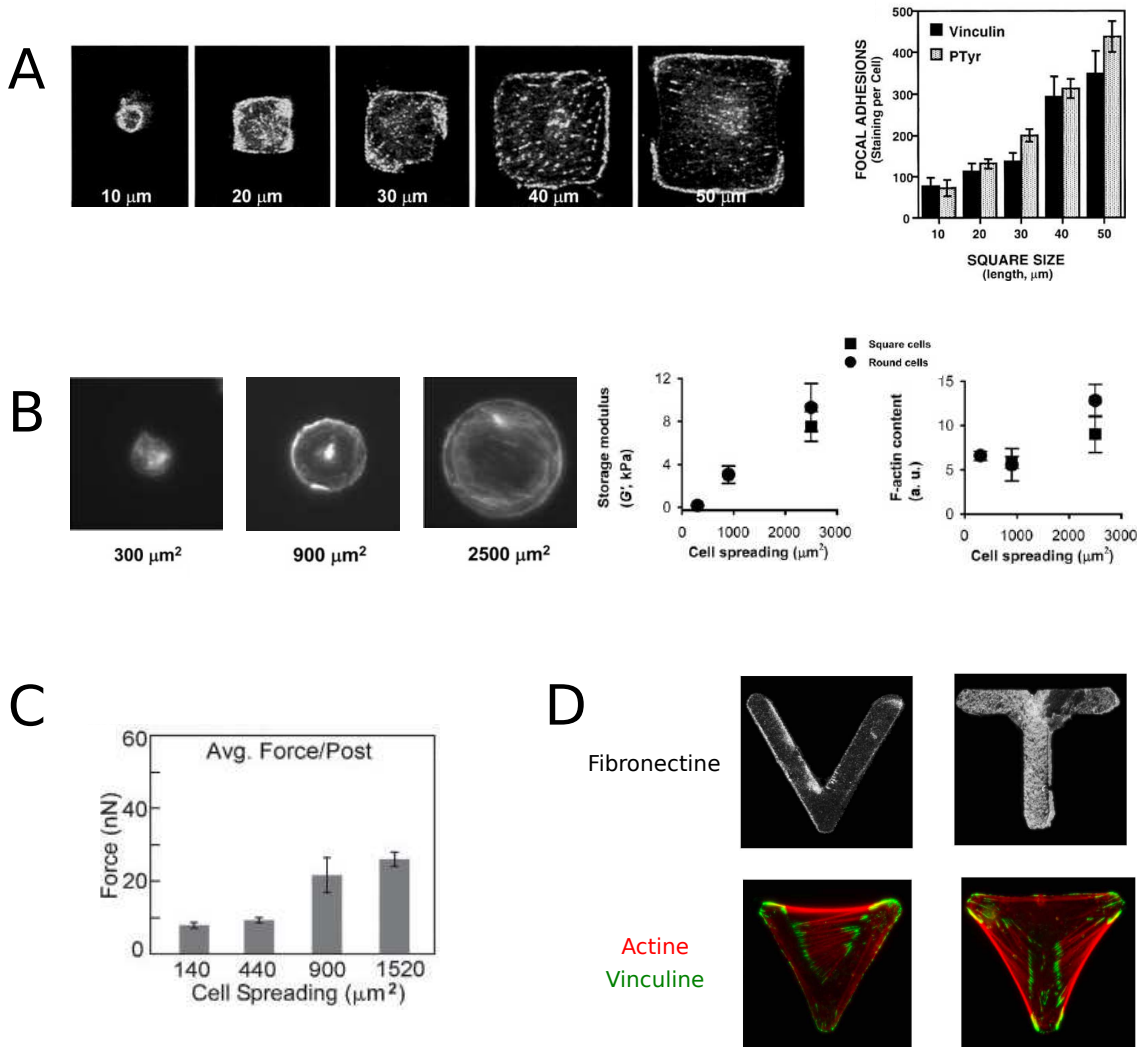


FIGURE 1.22 – A- A gauche, cellules endothéliales déposées sur des motifs de taille variable, la vinculine présente dans les adhésions est marquée par immunofluorescence. (Notons au passage que sur ces images la concentration en vinculine est plus grande en périphérie de la cellule quelle que soit la taille du motif.) A droite, quantification de la vinculine et de la phosphotyrosine présentes dans les adhésions [Chen *et al.*, 2003]. B- A gauche, cellules endothéliales déposées sur des motifs de taille variable, visualisation des fibres d'actine. A droite, module élastique et quantification de l'actine filamenteuse en fonction de la taille du motif [Roca-Cusachs *et al.*, 2008]. C- Force de en fonction de l'aire d'étalement de cellules de muscles lisses [Tan *et al.*, 2003]. D- Distribution des fibres d'actine et des complexes d'adhésion selon le motif adhésif de fibronectine chez des cellules RPE1 [Théry *et al.*, 2006].

des fibres de stress et la répartition des complexes d'adhésion peut varier selon le motif choisi, bien que la forme globale de la cellule reste identique (Fig 1.22-D).

Ces résultats rappellent étonnamment ceux évoqués dans la section 1.2 qui montraient une corrélation entre contractilité acto-myosine, force transmise au substrat au travers des adhésions et module visco-élastique de la cellule. Aussi peut-on imaginer qu'une modulation de l'aire cellulaire équivaut à faire varier la contractilité interne, toutes deux provoquant une modulation de la tension dans le cytosquelette dont les effets sont similaires.

Mais cet effet de l'étalement contrôlant la tension intracellulaire peut avoir des conséquences plus importantes pour la physiologie des cellules. Ainsi, [Pitaval *et al.* , 2010] ont montré que l'existence d'un cil chez des cellules de rétines n'était possible que lorsqu'elles sont cultivées sur de petits motifs ; dans le cas inverse le centrosome est contraint de se placer sous le noyau et ne peut donner naissance au cil. De plus, cet effet est annulé sur les grands motifs lorsque la myosine II est inhibée, preuve que la tension peut être à l'origine de modifications phénotypiques profondes.

Enfin, [Chen *et al.* , 1997] sont allés encore plus loin en démontrant qu'une part non-négligeables (environ 20%) des cellules endothéliales cultivées sur des motifs qui les contraignent à rester presque rondes présentent des facteurs de l'apoptose, ou mort programmée des cellules. Or, les cellules endothéliales sont généralement très étalées *in vivo*, ce résultat prouve donc que ces cellules savent qu'elles doivent mourir lorsqu'elles ne peuvent réaliser l'architecture pour laquelle elles sont programmées.

Cependant, il est notable que toutes les études présentées ici appliquent un confinement uniquement en deux dimensions. Or, les cellules vivent la plupart du temps dans un environnement à trois dimensions. Ainsi, si l'environnement influence à ce point la vie des cellules, le passage de deux à trois dimensions doit également être un critère à approfondir. La prochaine étape dans ce genre d'étude est donc de réaliser un confinement en 3D qui reproduise assez bien l'environnement physiologique cellulaire tout en permettant aux expérimentateurs de faire les mesures qu'ils pratiquent à 2D. Récemment, [Ochsner *et al.* , 2010] ont fait une avancée dans ce sens en parvenant à cultiver des fibroblastes dans des micropuits en PDMS. Ils ont ainsi pu montrer que le nombre et la densité des filaments d'actine augmentaient avec la rigidité du substrat en 3D comme en 2D. Toutefois, pour les faibles rigidités les filaments sont beaucoup plus nombreux et mieux définis sur les motifs plats que dans les patrons microstructurés.

1.3.2 Rigidité du substrat

Nous avons vu dans la partie précédente que les cellules d'un organisme humain nichent dans des tissus de rigidités très variées, allant de la dizaine de pascals à plusieurs centaines de kilopascals. Il est aujourd'hui possible de reproduire cette gamme de rigidité à l'aide de substrats synthétiques non toxiques pour les cellules et inertes chimiquement.

Les hydrogels en poly-acrylamide sont les plus couramment utilisés à cette fin. Dans ces gels, la maîtrise de la concentration en acrylamide permet de reproduire assez bien la gamme physiologique, avec des rigidités allant de la centaine de pascals à plusieurs dizaines de kilopascals [Levental *et al.* , 2007].

Par ailleurs, une autre technique courante est l'utilisation de gels secs de polydiméthylsiloxane (PDMS). La rigidité de ces gels est aussi contrôlable en faisant varier la concentration en cross-linkers dans le gel. Mais la gamme alors atteinte est relativement haute par rapport à la gamme physiologique. En revanche, ces gels ont la particularité d'être facilement sculptés à de très petites échelles à l'aide de techniques de photolithographie ; on parle de micro-fabrication. Cette possibilité est aujourd'hui exploitée pour construire des substrats de micro-piliers déformables par les cellules [Tan *et al.* , 2003]. L'ajustement du rapport Diamètre/Longueur des piliers permet d'atteindre des raideurs dans la gamme de sensibilité cellulaire [Saez *et al.* , 2005]. Un problème de cette technique - qui peut aussi être vu comme un atout - est que la surface de contact avec le substrat est nécessairement discontinue et limitée à quelques points dont l'espacement est donné.

Une dernière technique commence à être employée pour ce genre d'études ; il s'agit ici d'attraper des cellules entre deux plaques dont l'une est souple et peut être défléchie par la cellule, et l'autre est rigide. On utilise pour cela soit un AFM [Chaudhuri *et al.* , 2009], soit des microplaques de verre [Mitrossilis *et al.* , 2009]. Nous parlerons abondamment de cette technique dans le chapitre 3 car le dispositif que nous avons mis au point reprend cette idée. Notons tout de même immédiatement que les cellules sont ici placées dans un environnement complexe puisque la rigidité ressentie par la cellule dans la direction parallèle aux plaques est celle du matériau dont la plaque est constituée (métal ou verre) tandis que la raideur dans la direction perpendiculaire aux plaques dépend du rapport d'aspect de la plaque souple. Or, une plaque très effilée, même faite dans un matériau très rigide comme le verre, peut atteindre des raideurs très faibles, dans la gamme de sensibilité cellulaire.

Enfin, il est possible de reproduire les caractéristiques chimiques de la liaison cellule-matrice en recouvrant tous ces substrats d'une fine couche de protéines de matrice extra-cellulaire ; il s'agit le plus souvent de fibronectine.

La première étude concernant l'impact de la rigidité du milieu sur la vie des cellules animales date de la fin des années 1990 où RJ Pelham et Y-L Wang eurent l'idée de placer des fibroblastes sur des substrats en polyacrylamide de rigidités variables. Ils remarquèrent alors que les adhésions étaient moins stables et moins développées sur les substrats les plus mous et que la quantité de tyrosine phosphorylées en ces points était moins grande sur les substrats mous que sur les substrats durs. En outre, l'inhibition de la myosine II provoqua une disparition de cette sensibilité à la rigidité, tandis que l'inhibition d'une phosphatase de la tyrosine rétablit des adhésions stables sur les substrats les plus souples. Enfin, ils observèrent que la vitesse de migration des fibroblastes diminue de manière monotone avec la rigidité du substrat [Pelham & Wang, 1997].

D'autre part, [Engler *et al.* , 2004a] observèrent après 4h et 24h que l'étalement de cellules de muscles lisses est diminué sur des substrats mous. Plus précisément, l'aire des cellules augmente avec la rigidité jusqu'à environ 15 kPa avant d'atteindre un plateau. L'actine sous forme filamentueuse et les complexes d'adhésion s'adaptent alors en conséquence et croissent avec la rigidité de l'hydrogel¹⁴. Par ailleurs, ce comportement

14. Dans toute cette étude, nous n'évoquerons pas l'effet de la densité de ligands à la surface. Pourtant celui-ci a un effet à la fois sur l'étalement cellulaire [Engler *et al.* , 2004a] et sur la migration [Palecek *et al.* , 1997]. Dans les deux cas, l'aire cellulaire et la vitesse de migration augmentent puis

pourrait être généralisable à toutes les cellules adhérentes puisque [Solon *et al.* , 2007] remarquèrent la même chose sur des fibroblastes (Fig 1.23-A).

De plus, de manière analogue, un tissu épithélial placé sur un substrat de rigidité anisotrope faits de micro-piliers de section ovale s'aligne dans la direction de la plus grande rigidité en même temps que la plupart des cellules qui le composent [Saez *et al.* , 2007].

Alors, suivant l'idée évoquée plus haut que des adhésions plus allongées et une aire d'étalement plus grande peuvent correspondre à une plus grande tension au sein du cytosquelette d'acto-myosine, on pouvait s'attendre à ce que la force transmise au substrat et la rigidité des cellules varient avec la rigidité de l'environnement de la même manière que l'aire d'étalement des cellules. Et c'est en effet ce qui a été démontré par [Solon *et al.* , 2007] pour la rigidité cellulaire et [Saez *et al.* , 2005; Mitrossilis *et al.* , 2009] pour la force de traction¹⁵ : ces deux paramètres augmentant avec la rigidité du substrat jusqu'à atteindre un plateau (Fig 1.23-A et B).

Toutefois, toutes les mesures présentées jusqu'ici ont été réalisées en statique. Or, pour mieux comprendre l'origine d'un phénomène naturel, avoir accès à sa dynamique est toujours un outil formidable. Le début de ce travail a été réalisé au laboratoire dans la thèse de Démosthène Mitrossilis où, grâce au dispositif de microplaques, nous avons pu avoir accès à la vitesse à laquelle la cellule défléchit des microplaques de raideurs variables. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'accroissement de force (dF/dt) au cours du temps est sensible à la raideur de la plaque et ce dès les premiers instants de la traction. En particulier, il augmente proportionnellement à la raideur jusqu'à environ $60 \text{ nN}/\mu\text{m}$ avant d'atteindre un plateau [Mitrossilis *et al.* , 2009] (Fig 1.23-B). Le même type de résultats a été reproduit sur plusieurs types cellulaires au laboratoire (myoblastes, fibroblastes) et par [Lam *et al.* , 2010], dans le groupe de Daniel Fletcher, en utilisant un AFM pour mesurer des forces de traction développées par des plaquettes.

A la suite de cela, les deux équipes ont mis au point à partir de leur dispositif initial, une méthode pour modifier la raideur ressentie par la cellule en temps réel au cours de la traction. Ils ont alors démontré que dF/dt s'adapte à la raideur en un temps inférieur à 0,1s et ce indépendamment de la charge tractée par la cellule [Mitrossilis *et al.* , 2010; Webster *et al.* , 2011] (Fig 1.23-C). Nous discuterons beaucoup ces résultats par la suite puisque nous nous sommes attachés à aller plus loin dans notre thèse en mesurant, en parallèle, la force de traction et la dynamique des complexes d'adhésion dans des conditions de raideur variable.

Mais tous les résultats présentés jusqu'alors s'intéressent uniquement à l'influence de la rigidité sur des paramètres mécaniques (forme, force,...). Or, la rigidité peut avoir une influence plus grande encore sur le destin des cellules. Les résultats obtenus par Adam Engler dans sa thèse dans le groupe de Dennis Discher en sont le meilleur exemple.

Son travail a commencé par l'étude de myoblastes, cellules souches pré-musculaires

diminuent avec la concentration en ligands.

15. [Ladoux *et al.* , 2010] démontrèrent plus tard la même relation pour des piliers couverts de cadhérines avec toutefois des forces en moyenne deux fois moins élevées. (Nous devons nous rappeler cette réponse non-spécifique au type d'adhésion lorsque nous chercherons à expliquer ces résultats dans la prochaine section.)

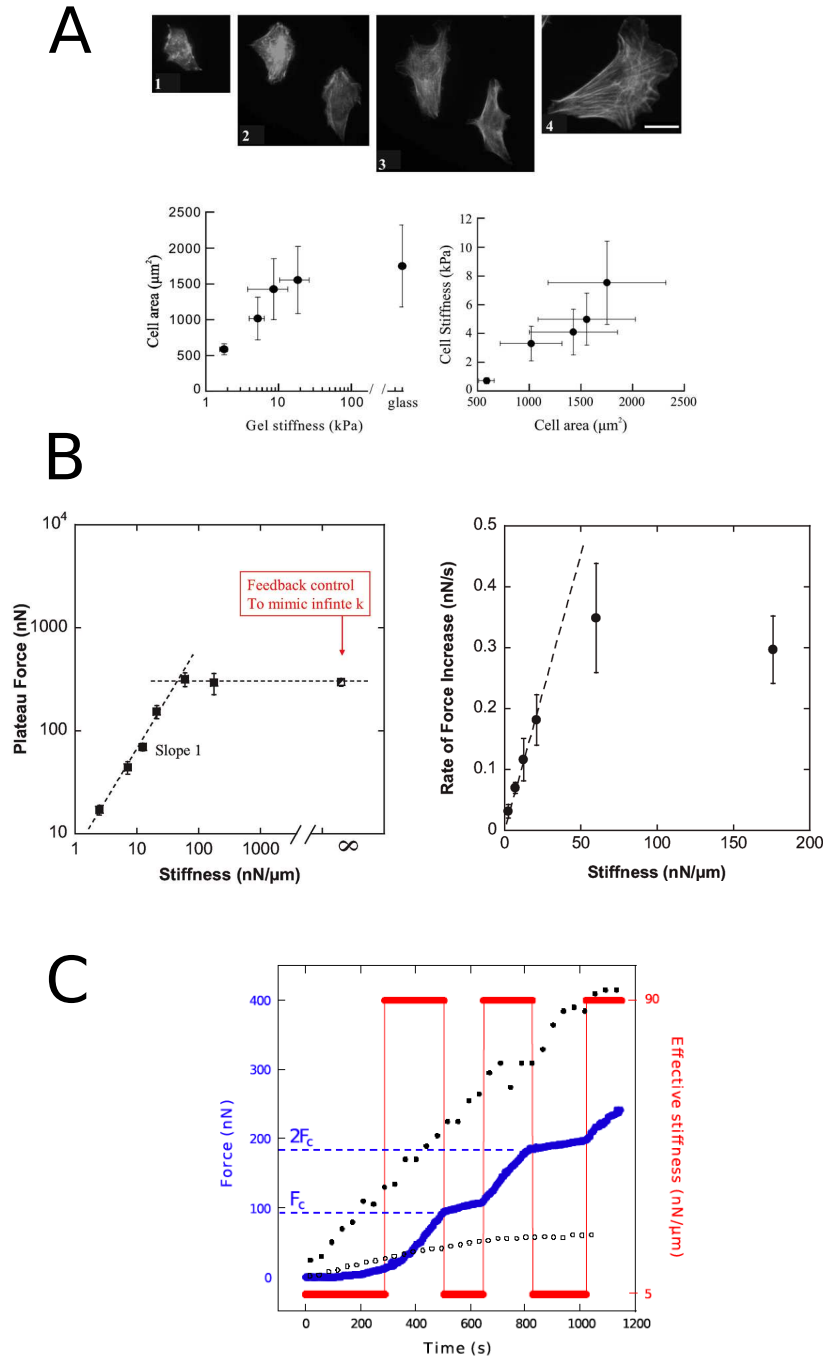


FIGURE 1.23 – A- En haut, fibroblastes déposés sur des gels de rigidités 1 kPa gel (1), 5 kPa (2), 10 kPa (3), et sur du verre (rigidité infinie) (4) ; l'actine est marquée à la rhodamine-phalloïdine. En bas, l'aire d'étalement et la rigidité apparente des cellules croissent avec la rigidité du substrat [Solon *et al.* , 2007]. B- A gauche, force de traction maximale développée par des myoblastes entre deux microplaques de verre en fonction de la raideur de la plaque souple. A droite, accroissement de la force de traction, mesuré pour une déflexion de $1\ \mu m$, en fonction de la raideur de la plaque souple [Mitrossilis *et al.* , 2009]. C- Force de traction cellulaire au cours du temps avec variation de la raideur effective de la microplaque [Mitrossilis *et al.* , 2010]

qui fusionnent lorsqu'on les met en culture pour former des myotubes, cellules musculaires différenciées qui sont striées et capables de contraction. Il cultiva d'abord ces myoblastes sur une couche de myotubes et observa que les myotubes formés montraient une meilleure striation que sur du verre. Puis il fabriqua des gels de rigidités différentes autour de celle des myotubes et observa que la striation est optimale sur les substrats dont la rigidité mime exactement celle des myotubes [Engler *et al.* , 2004b] (Fig 1.24-A). Ainsi, la différenciation vers un phénotype musculaire est mieux réalisée sur la couche de myotubes non pas pour des raisons chimiques (par exemple grâce à l'échange de facteurs solubles) mais à cause de leur rigidité.

Adam Engler généralisa ensuite cette idée sur des cellules souches mésenchymateuses qu'il cultiva dans un même environnement chimique mais sur trois substrats de rigidités différentes, l'un mimant la rigidité du cerveau, l'autre mimant la rigidité du muscle et le dernier mimant la rigidité de l'os [Engler *et al.* , 2006]. Il observa alors que le phénotype (forme et expression génique) pris par les cellules souches s'accorde avec le tissu dont le substrat mime la rigidité. Autrement dit, les cellules prennent un phénotype neuronal sur le substrat mimant le cerveau, un phénotype de myoblaste sur le substrat mimant le muscle et un phénotype d'ostéoblaste sur le substrat mimant l'os (Fig 1.24-B). En outre, cette orientation de la différenciation est annihilée par l'inhibition de la myosine II, ce qui souligne encore le rôle de ces moteurs moléculaires dans la sensibilité des cellules à la rigidité.

1.3.3 Étirement - cisaillement - compression

Les cellules subissent en permanence des forces provenant de l'extérieur ; elles sont ainsi tendues, cisailées, comprimées à des fréquences et amplitudes diverses. Afin d'étudier l'effet de ces forces sur les cellules, les chercheurs tentent aujourd'hui de reproduire ces efforts en laboratoire ¹⁶.

Contraintes à l'échelle globale

Ainsi, il est possible d'étudier la réponse de cellules entières aux contraintes tensiles en les cultivant sur des membranes étirables. Un des résultats les plus importants obtenu à l'aide de cette technique est que les cellules s'alignent en fonction de la direction de l'étirement. Par exemple, un étirement statique provoque un alignement des cellules dans la direction de la contrainte appliquée sur le substrat [Eastwood *et al.* , 1998]. Le même phénomène, qui rappelle l'allongement observé sur des substrats de rigidité anisotrope, apparaît lorsqu'on soumet la cellule à un cisaillement par un flux liquide constant [García-Cardena *et al.* , 2001] .

En revanche, dans le cas d'une sollicitation cyclique, la direction de l'alignement est perpendiculaire à l'étirement [Yoshigi *et al.* , 2005; Jungbauer *et al.* , 2008]. Cependant, selon certains auteurs, cet alignement pourrait dépendre de la fréquence à laquelle la contrainte est appliquée. Ainsi, les cellules s'aligneraient perpendiculairement à la

16. Ces recherches ont des implications fondamentales mais aussi très appliquées ; en effet, une mauvaise régulation de ces forces peut directement être responsable de maladies comme l'athérosclérose [García-Cardena *et al.* , 2001] ou l'asthme [Fabry & Fredberg, 2007].

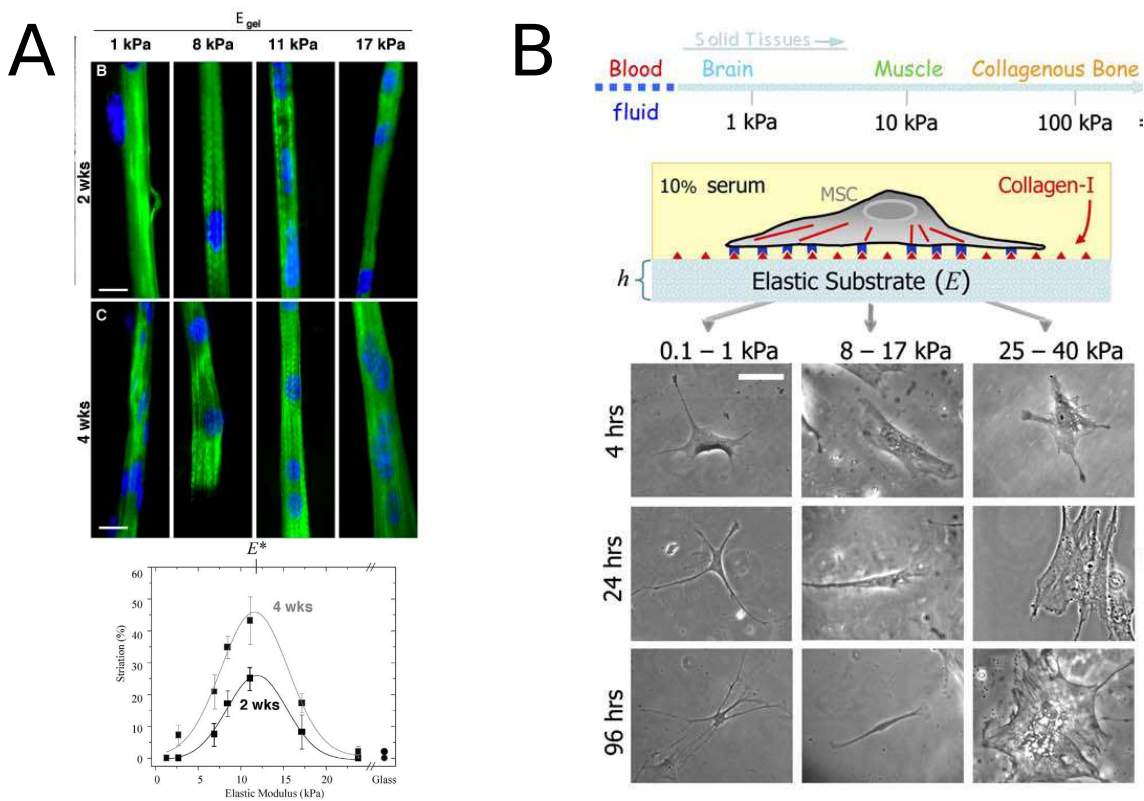


FIGURE 1.24 – A- Image en microscopie de fuorescence et graphe montrant la striation des myotubes en fonction de la rigidité de leur substrat. L'actine est en vert, le noyau en bleu [Engler *et al.* , 2004b]. B- Schéma et images montrant la différenciation de cellules souches mésenchymateuses selon la rigidité de leur substrat [Engler *et al.* , 2006].

contrainte seulement pour des fréquences supérieures à 1Hz¹⁷ [Faust *et al.* , 2011; De *et al.* , 2007].

Dans tous les cas, cet alignement des cellules est corrélé à une orientation des fibres de stress et des adhésions focales dans la direction de l'élongation (Fig 1.25-A et B) [García-Cardena *et al.* , 2001; Yoshigi *et al.* , 2005]. Par ailleurs, certaines protéines des adhésions peuvent subir des réarrangements complexes pendant ce processus. Par exemple, la zyxine migre des adhésions focales vers les fibres de stress sous l'effet d'un étirement ou d'un cisaillement, tandis que la vinculine reste stationnée dans les adhésions [Yoshigi *et al.* , 2005].

[Trepatt *et al.* , 2007] se sont quant à eux intéressés aux conséquences de l'étirement de cellules dans leur ensemble sur leurs propriétés mécaniques. Ils mesurèrent localement ces propriétés à l'aide d'une bille déposée à la surface de la cellule et remarquèrent ainsi que la cellule se fluidifie (diminution du module élastique) sous l'effet de l'étirement et ce d'autant plus que la déformation de départ est grande. Ensuite, après arrêt de l'étirement, la cellule se rigidifie jusqu'à retrouver sa rigidité initiale après environ 200s (Fig 1.26-A).

Pour finir, de nombreuses études ont montré que les contraintes externes ont également une grande influence sur des aspects plus globaux de la physiologie cellulaire. Par exemple, [García-Cardena *et al.* , 2001] ont montré que l'expression de nombreux gènes de cellules endothéliales était modifiée lorsque celles-ci sont soumises à un flux de liquide. De plus, la nature de ce flux (laminaire ou turbulent) oriente cette expression. Le tableau de la figure 1.25-C propose un aperçu d'autres études ayant observé l'effet de contraintes extérieures sur diverses fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, synthèse de matrice extra-cellulaire,...).

Contraintes à l'échelle locale

Mais on peut également observer la réponse des cellules à une sollicitation extérieure sur une échelle plus locale en déposant à leur surface des billes de taille micronique connectées au cytosquelette *via* des liaisons intégrines ou cadhérines. Il est possible d'appliquer des forces sur le cytosquelette à travers ces billes à l'aide de pinces optiques ou magnétiques. On obtient ainsi des forces de quelques pico-newtons qui tendent à reproduire les forces que peuvent générer, localement, les cellules sur leurs voisines.

De cette manière, [Wang *et al.* , 1993] ont montré que la cellule se rigidifie sous l'effet de l'application d'une force. Ils interprétèrent ce résultat comme la réponse d'une structure tensogre¹⁸, où l'actine évoluerait en tension et les microtubules en compression.

17. Il est intéressant que cette fréquence de 1Hz reparaisse ici; nous avons en effet noté dans la section précédente que c'était autour de cette fréquence qu'oscillaient les forces cycliques nécessaires à la survie de nos organismes (marche, respiration, battements cardiaques).

18. La tenségrité est un concept que Donald Ingber a emprunté à l'architecture et qu'il a tenté d'appliquer à l'architecture cellulaire, en particulier au cytosquelette. Comme nous le verrons dans la section suivante, l'idée que des propriétés originales des cellules puissent émerger de la structure mécanique du cytosquelette est certainement bonne. Cependant, si les expériences de mécanique cellulaire sur le rôle de la tension acto-myosine sont très convaincantes, celles pratiquées sur les microtubules, et leur rôle supposé de colonnes en compression, sont moins facilement interprétables. On peut alors se demander quel acteur est comprimé, puisque dans tout système mécanique, lorsque des éléments sont

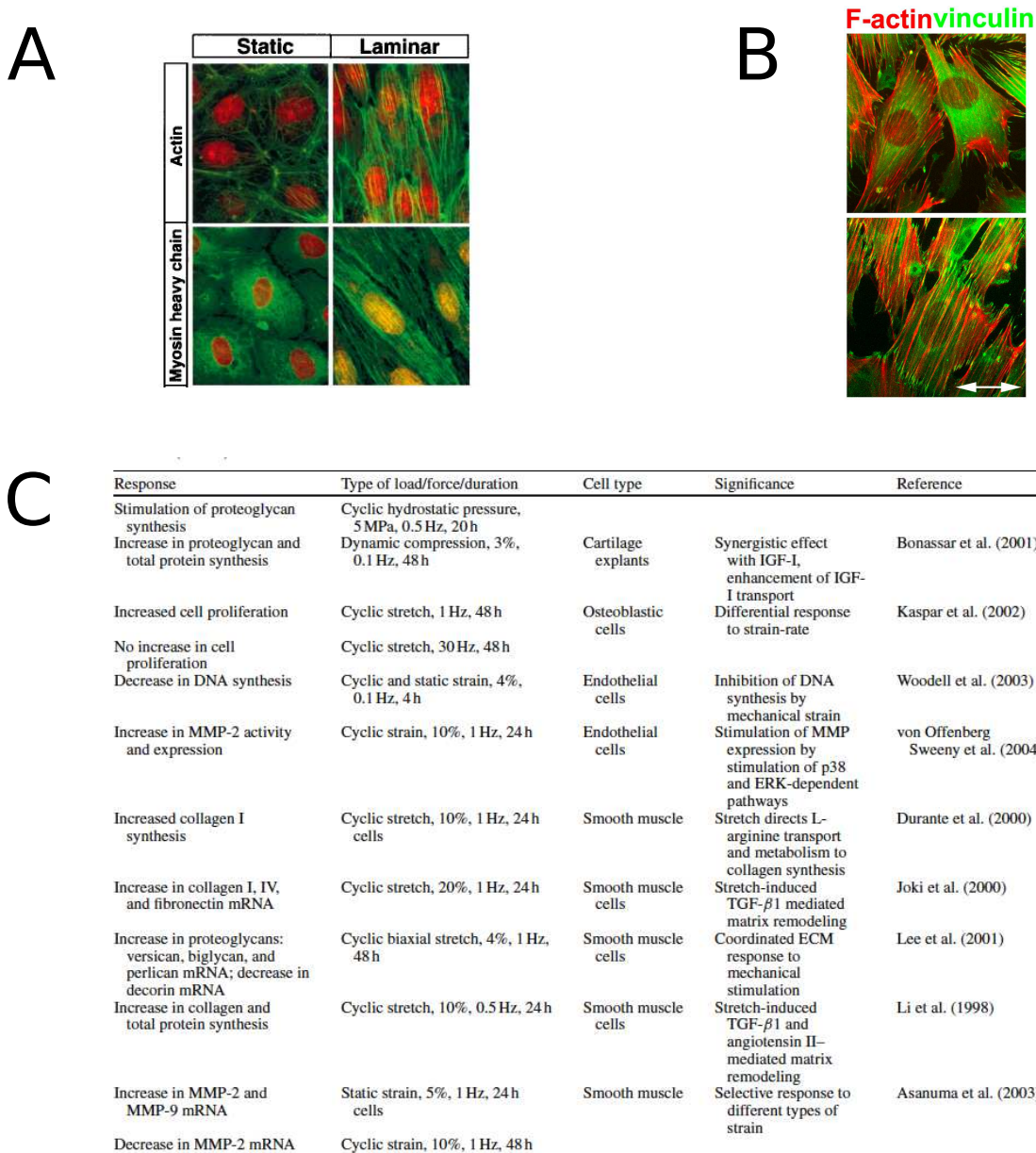


FIGURE 1.25 – A- Alignement des cellules et des fibres d'acto-myosine dans la direction du flux laminaire constant [García-Cardena *et al.*, 2001]. B- Alignement des cellules, des fibres d'acto-myosine et des adhésions focales dans la direction perpendiculaire à l'étirement (indiqué par la flèche) [Yoshigi *et al.*, 2005]. C- Tableau récapitulatif des modifications de la physiologie de plusieurs types cellulaires en réponse à des contraintes extérieures [Wang & Thampatty, 2006].

De plus, cette rigidification est corrélée à un recrutement des protéines adaptatrices (taline, vinculine, alpha-actinine) au niveau du contact bille-cellule.

[Icard-Arcizet *et al.* , 2008] ont obtenu des résultats similaires : en appliquant des créneaux de forces successifs, ils observèrent une rigidification de la cellule correspondant à un recrutement d'actine (Fig 1.26-B), ce qui pourrait être une autre manière d'interpréter la rigidification sous l'effet de la force.

Ces résultats semblent contradictoires avec ceux de [Trepap *et al.* , 2007] présentés plus haut. Naturellement, il faudrait comprendre ce qui fait qu'une force appliquée sur toute la cellule produit un effet inverse à une force appliquée localement ; une hypothèse est qu'un étirement trop violent (c'est-à-dire ample et rapide) détruit les liens dans le cytosquelette d'acto-myosine, ce qui fluidifierait la structure le temps qu'elle se recompose.

Pour finir, évoquons une étude passionnante par [Chowdhury *et al.* , 2009] sur l'étalement et la différenciation de cellules embryonnaires en réponse à une force locale oscillante. Les auteurs remarquèrent tout d'abord que l'application d'une force sur le cortex à l'aide d'une bille micronique peut provoquer l'étalement cellulaire. Puis ils observèrent que cet étalement était d'autant plus important que la cellule était originelle. Autrement dit, les cellules embryonnaires restées cellules souches s'étaient plus sous l'effet de la sollicitation que les mêmes cellules lorsqu'elles sont différenciées. Ils relient cette observation aux propriétés mécaniques de ces cellules ; en effet, les cellules originelles sont plus molles que les cellules différenciées. Ils montrèrent ensuite que l'application de la force a aussi pour conséquence de diminuer l'expression de Oct3/4 chez les cellules embryonnaires, diminution qui est un marqueur de la différenciation chez ces cellules. Cette observation établit donc un lien nouveau entre force externe, forme et phénotype cellulaire.

1.3.4 En bilan

Après cette longue énumération, il ne fait plus aucun doute que les cellules sont sensibles à leur environnement mécanique. Quels sont les principaux enseignements que l'on peut tirer de ces observations en vue de comprendre ces phénomènes de mécano-sensibilité ?

Tout d'abord, on remarque que les réponses de l'architecture cellulaire aux divers paramètres mécaniques ont des caractéristiques communes qui semblent toutes aller dans le même sens.

Ainsi, l'application d'une force locale induit une rigidification de la cellule associée à un recrutement d'actine et de protéines adaptatrices des adhésions. De même, le confinement géométrique, que l'on peut voir comme l'inhibition d'une force interne tendant la structure cellulaire, diminue la rigidité de la cellule et rend le réseau d'actine plus diffus que lorsque les cellules sont laissées libres de s'étaler ; les adhésions focales sont également moins développées dans ce cas. Enfin, on observe des effets similaires en faisant varier la rigidité du substrat : plus le substrat est rigide, plus la cellule est rigide, le cytosquelette d'actine est quant à lui organisé en fibres de stress et les adhésions allongées. A noter tout de même que l'étalement est aussi augmenté sur les

sous tension, d'autres doivent travailler en compression. Notre hypothèse est que c'est tout simplement le substrat qui est comprimé.

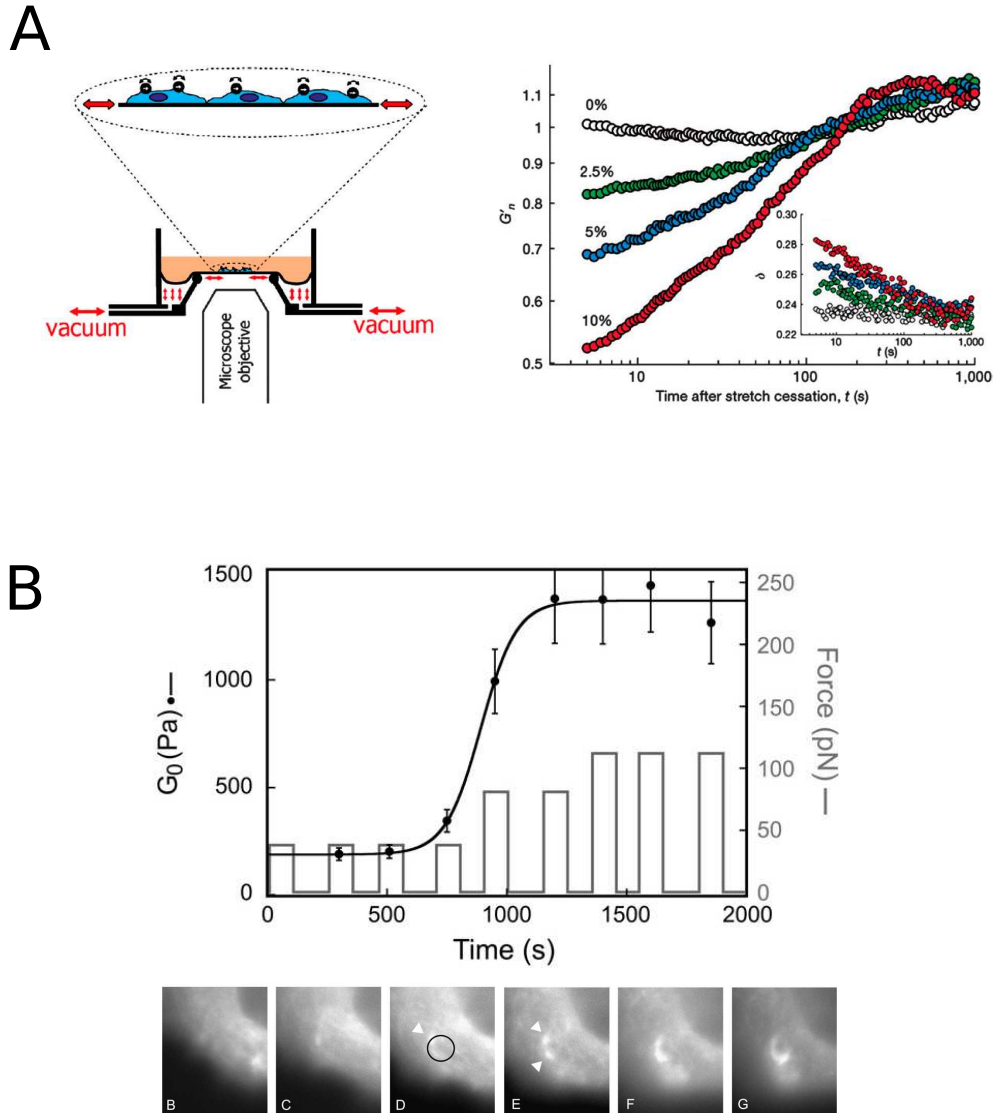


FIGURE 1.26 – Propriétés mécaniques des cellules en fonction de contraintes externes. A- A gauche, dispositif d'étirement des cellules et de mesures des propriétés mécaniques. A droite, module élastique des cellules en fonction du temps après relachement de la contrainte pour différentes déformations initiales [Trepap *et al.* , 2007] B- En haut, module visco-élastique de myoblastes et force externe appliquée sur la bille en fonction du temps. En bas, image en microscopie de fluorescence montrant le recrutement d'actine au cours du temps [Icard-Arcizet *et al.* , 2008]

substrats les plus rigides ; ainsi, l'influence de la rigidité sur les forces de traction et la croissance des adhésions focales pourrait se faire au travers de l'étalement.

Toutes ces observations peuvent être résumées en utilisant une image où l'on assimilerait une cellule à une toile de tente. En effet, pour tendre la toile (c'est-à-dire l'étaler), on a besoin de planter des piquets dans le sol (autrement dit de faire des adhésions) ; et plus on veut la tendre, plus les piquets ont besoin d'être gros, ou nombreux. Alors, on verra qu'en appuyant avec notre doigt sur la toile, la déformation sera d'autant plus faible à force donnée que la toile est tendue, autrement dit la toile apparaîtra plus rigide si elle est tendue. De plus, les piquets ont tendance à glisser quand on cherche à les ancrer dans un terrain boueux, c'est-à-dire de faible rigidité. Il devient alors impossible de tendre la toile ; c'est l'histoire des vacances en camping catastrophiques...

Mais si cette image peut être utile à la rêverie autour de notre problème, elle ne nous renseigne pas sur les mécanismes responsables de cette réponse caractéristique de l'architecture cellulaire. Et elle explique encore moins la régulation des fonctions plus générales que nous avons évoquées dans les paragraphes précédents.

L'autre point remarquable qui se dégage de ces expériences est qu'un peu à l'image des hommes¹⁹, les cellules ont tendance à se faire le miroir de leur environnement mécanique. Ainsi, elles prendront la forme du substrat adhésif qui leur est présenté qu'il soit rond, carré ou triangulaire ; elles seront rigides sur un substrat rigide, molles sur un substrat mou ; elles s'allongeront dans la direction de la force quelle que soit le type de cette force (tension, cisaillement) ; et même, elles se différencieront pour produire le tissu que mime la rigidité de leur substrat : elles deviendront neurones sur un substrat de la rigidité du cerveau,...

Nous n'avons aucune idée des implications possibles de cette propriété, qui d'ailleurs est peut-être fortuite, mais il est possible qu'elle ait des conséquences importantes, notamment sur le plan évolutif.

Quoi qu'il en soit, toutes ces expériences, en montrant l'importance de l'environnement mécanique sur le phénotype des cellules, doivent nous encourager à développer des environnements de culture toujours plus semblables à ceux que rencontrent les cellules *in vivo*, et surtout à pratiquer autant que possible les expériences de biologie cellulaire dans ces environnements.

1.3.5 Les cellules façonnent leur environnement mécanique (supplément de complexité)

Nous venons de voir que l'environnement mécanique influence la vie des cellules animales. Mais il faut aussi noter qu'une bonne part de l'environnement mécanique est façonné par les cellules elles-mêmes. On distingue ainsi plusieurs mécanismes à l'origine de cette régulation.

D'une part, la régulation du nombre de mitose et d'apoptose peut varier selon les stades du développement de l'organisme et ainsi modifier le confinement des cellules. Ensuite, la sécrétion des protéines de matrice par les cellules peut varier selon les tissus [Wang & Thampatty, 2006] ; ce sont donc les cellules qui déterminent la composition

19. Robert Musil écrivait dans *L'homme sans qualités* : "Nous sommes une matière qui épouse toujours la forme du premier monde venu."

et les proportions des composants de la matrice. Enfin, il est possible que les cellules puissent modifier la structure et les propriétés mécaniques de certaines fibres de la matrice en leur appliquant des forces ; par exemple, la fibronectine se rigidifie sous l'effet de forces comparables à celles appliquées par les cellules²⁰ [Zhong *et al.* , 1998].

Finalement, on peut donc imaginer une vaste boucle de rétroaction mécanique *environnement* \rightleftharpoons *cellule* dans laquelle l'environnement mécanique influencerait la vie des cellules, lesquelles modifieraient leur environnement mécanique en réponse à celui-ci, qui à son tour changerait le destin des cellules etc... Ce phénomène est sans doute une des causes principales de l'homéostasie qui permet le maintien de l'intégrité des tissus à l'âge adulte. Cependant, les propriétés mécaniques des tissus évoluent tout au long de la vie. Ainsi, la taille des os croît pendant l'enfance tandis que celle du cartilage diminue ; d'un autre côté, la peau devient moins tendue avec l'âge. On peut donc penser que la mécanique est fortement impliquée non seulement dans les mécanismes du développement mais aussi du vieillissement.

20. Les cellules ne sont toutefois pas seules responsables de l'organisation de la matrice : les forces appliquées sur l'ensemble de l'organisme, ou encore l'auto-organisation émergeant, à l'image des cristaux liquides, de propriétés physico-chimiques de ses composants [Belamie *et al.* , 2006] sont sans doute aussi impliquées dans le modelage des tissus.

1.4 Mécanismes d'intégration des signaux mécaniques

Les très nombreuses expériences présentées dans la section précédente ont montré que les cellules sont sensibles à divers paramètres mécaniques (confinement, rigidité, forces). Nous aimerions maintenant chercher à comprendre quels mécanismes sont à l'origine de cette sensibilité. Plusieurs hypothèses sont envisageables.

Tout d'abord, le matériau lui-même pourrait être sensible aux contraintes mécaniques, internes comme externes. En effet, les matériaux complexes possèdent en général des réponses complexes aux contraintes qui leur sont imposées. Il peut s'agir de réarrangements, rigidification, fluidification,... etc. Ainsi, les modifications de l'architecture cellulaire détaillées ci-dessus pourraient être le simple fait des propriétés du matériau, notamment du cytosquelette d'acto-myosine.

Ensuite, on peut imaginer des mécanismes de réponses chimiques du type cascades de signalisation. Mais cette hypothèse nécessite l'existence d'un engin de transmission (protéine ou autre) qui traduirait le signal mécanique en signal biochimique²¹ et lancerait ainsi la réaction dont l'aboutissement serait par exemple de modifier l'activité contractile ou protrusive de la cellule.

Enfin, des régulations génétiques sont nécessaires notamment pour expliquer les modifications phénotypiques en réponse à l'environnement mécanique. Ces régulations peuvent être initiées soit par les cascades de signalisation que nous venons d'évoquer, soit par des mécanismes épigénétiques : on peut penser par exemple à une déformation du noyau induisant une modification de l'accessibilité de la chromatine sous l'effet des changements de l'architecture cellulaire.

Il est notable que les temps de réponse associés à ces différents mécanismes seront potentiellement très différents. Ils peuvent être très courts, limités seulement par la vitesse du son dans le cas des réponses dues au matériau, de l'ordre de la minute pour les mécanismes chimiques ayant une portée cellulaire, et de l'ordre de la dizaine de minute au minimum pour passer de la transcription d'un gène en ARN puis à sa traduction en protéine.

Examinons maintenant un à un ces différents mécanismes dans l'ordre proposé ci-dessus, du plus physique au plus biologique.

1.4.1 Réponse du cytosquelette à l'échelle globale

Nous présentons ici des modèles issus de la physique de la matière molle et qui fournissent un premier cadre pour comprendre l'adaptation des forces de traction à la rigidité de l'environnement mais aussi la polarisation des cellules en réponse à cette rigidité ou aux forces externes.

Comme nous l'écrivions en 1.3, deux groupes ont récemment mis au point deux dispositifs semblables de mesures de force de traction à l'échelle cellulaire permettant de modifier en temps réel la raideur ressentie par la cellule. Un résultat étonnant a émergé de cette avancée technique : la force de traction cellulaire s'adapte à la rigidité du substrat en un temps très court (inférieur à 0,1s), et ce quel que soit le niveau de force auquel la raideur est modifiée.

21. Il est intéressant de noter qu'une telle molécule est en quelque sorte l'inverse fonctionnel des moteurs moléculaires, qui traduisent l'énergie chimique en énergie mécanique.



FIGURE 1.27 – Portrait d'Archibald Vivian Hill (1886-1977)

Cette découverte a remis en cause les présupposés (dont nous parlerons au paragraphe suivant) sur les mécanismes contrôlant la réponse des cellules à la rigidité et a forcé les chercheurs à imaginer d'autres explications. En effet, un temps de réponse aussi rapide à l'échelle de toute la cellule ne peut être expliqué par des cascades de signalisation chimique dont les temps de réponse à cette échelle sont plutôt de l'ordre de la minute [Na *et al.* , 2008]. Le phénomène capturé ici est donc probablement le fait d'une propriété du matériau contractile. Deux mécanismes ont été proposés allant dans ce sens.

Une première idée est que cette adaptation à la charge est similaire à celle du muscle. En effet, [Mitrossilis *et al.* , 2009] ont montré que la force de traction cellulaire à l'équilibre est directement proportionnelle à l'activité ATPasique de la myosine ; de plus, ils ont mis en évidence que la relation force-vitesse de la cellule (et plus généralement l'adaptation de la force et de la dérivée de la force de traction en fonction de la raideur) est parfaitement ajustable par une loi de Hill adimensionnée (Fig 1.28-A), loi qui fut découverte par Hill lorsqu'il étudiait la contraction des muscles striés [Hill, 1938] puis généralisée à tous les muscles y compris les muscles lisses [Gordon & Siegman, 1971]. Ainsi, tout comme chez le muscle, la machinerie acto-myosine des cellules pourrait répondre quasi-instantanément à une modification de la charge.

La seconde idée suggère un mécanisme du type adaptation d'impédance. Plusieurs études ont ainsi convergé vers un modèle mettant en jeu deux ressorts en série, l'un symbolisant le substrat, l'autre la cellule, qui seraient plus ou moins tendus selon le rapport de leurs raideurs respectives et la force tensile générée par la cellule [Mizuno *et al.* , 2009; Marcq *et al.* , 2011; Zemel *et al.* , 2010; Crow *et al.* , 2012].

A titre d'exemple, détaillons le modèle proposé par [Marcq *et al.* , 2011]. Dans ce modèle, la cellule est représentée par un matériau élastique que l'on peut réduire à un ressort de longueur l_c et de raideur k_c qui est étiré par l'étalement. La cellule applique sur le substrat une force active F_A et le substrat est représenté par un autre ressort de longueur l_{ext} et de raideur k_{ext} . Le bilan des forces donne ainsi l'équation :

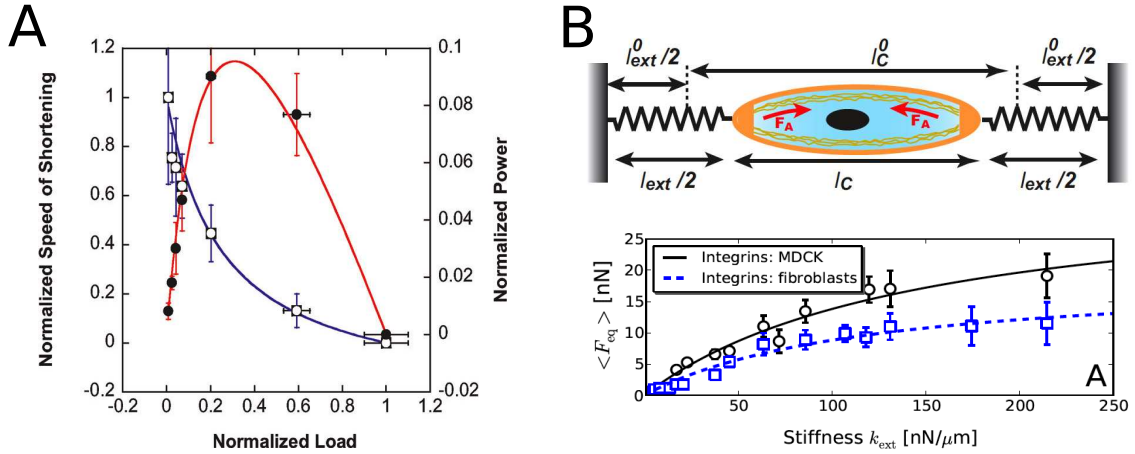


FIGURE 1.28 – A- Vitesse de raccourcissement et puissance développée par des myoblastes en fonction de la force de traction. Force et vitesse sont normalisées par leur valeur maximum chez les myoblastes. Les deux courbes sont ajustées par une loi de Hill adimensionnée [Mitrossilis *et al.* , 2009]. B- En haut, schéma modélisant la cellule comme une structure élastique tensile connecté à un ressort représentant le substrat. En bas, force moyenne sur des micropiliers de raideur variable et ajustement par le modèle décrit par [Marcq *et al.* , 2011].

$$k_c(l_c(t) - l_c^0) + F_A = k_{ext}(l_{ext}(t) - l_{ext}^0) \quad (1.3)$$

Cette forme donne, pour la force à l'équilibre F_{eq} , une équation de la forme :

$$F_{eq} = F_A + \frac{k_{ext}k_c}{k_{ext} + k_c}(l_{tot} - l_{ext}^0 - l_c^0) \quad (1.4)$$

ce qui ajuste très bien le comportement de la force à l'équilibre en fonction de la raideur, sur intégrine comme sur cadhérine sans avoir à recourir à un mécanosenseur spécifique (Fig 1.28-B). De plus, un tel modèle purement mécanique peut expliquer l'adaptation instantanée de la force de traction à la raideur.

Un autre modèle mettant en jeu le cortex d'acto-myosine a été développé pour expliquer la polarisation des cellules en réponse à une tension externe ou à la rigidité du substrat [De *et al.* , 2007].

Il s'agit ici de représenter chaque pont contractile par un dipôle de force élastique pouvant changer d'orientation en réponse à une force externe. La somme de tous ces dipôles donne donc naissance à dipôle macroscopique orienté dans la direction de l'allongement de la cellule lorsque celle-ci est polarisée.

Au même titre que pour des dipôles magnétiques, les dipôles s'alignent dans le sens de la sollicitation externe si celle-ci est assez lente devant le temps de relaxation du système *fibres de stress + adhésions focales* (de l'ordre de quelques minutes). En revanche, lorsque la sollicitation est trop rapide devant ce temps, les dipôles ne peuvent s'aligner dans cette direction, la cellule se polarise donc dans la direction perpendiculaire à la sollicitation.

De plus, ce modèle permet de décrire la polarisation des cellules en réponse à la rigidité de leur substrat, polarisation que l'expérience comme la théorie trouvent optimale

sur un substrat de rigidité égale à celle de la cellule [Zemel *et al.* , 2010].

1.4.2 Détection de l'environnement mécanique à l'échelle locale

Mécanosensibilité des complexes d'adhésion

Nous avons vu au paragraphe 1.2 que la croissance des adhésions est sensible aux forces produites par le cytosquelette d'acto-myosine, mais aussi aux forces externes. Cette mécano-sensibilité pourrait donc être à l'origine de l'adaptation de l'architecture cellulaire à l'environnement mécanique extérieur. Il apparaît donc nécessaire de comprendre quels mécanismes contrôlent cette sensibilité. Deux types de modèles décrivent les résultats observés expérimentalement.

Dans une première approche, [Nicolas *et al.* , 2004] et [Bruinsma, 2005] ont postulé que la contrainte exercée sur une adhésion naissante induit une déformation élastique de ce complexe. La différence entre les deux modèles réside dans l'étage au niveau duquel s'opère la déformation : pour [Nicolas *et al.* , 2004] cette déformation a lieu au niveau de la jonction avec la matrice extra-cellulaire, c'est-à-dire au niveau des intégrines, tandis que pour [Bruinsma, 2005] la protéine déformée se trouve parmi les protéines adaptatrices qui font la connexion entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. Mais, dans les deux cas, cette déformation pourrait être à l'origine de changements de conformation d'une ou plusieurs protéines de ces adhésions, qui permettraient le recrutement de nouvelles protéines jonctionnelles (Fig 1.29-A). Ainsi, ce modèle expliquerait la croissance des adhésions dans le sens de la force appliquée et proportionnellement à cette force.

Un tel modèle suppose donc l'existence d'une protéine localisée dans les adhésions et qui pourrait subir un changement conformationnel sous l'effet d'une force mécanique. Une protéine candidate pour jouer ce rôle est la kinase p130 Cas. [Sawada *et al.* , 2006] ont en effet montré que cette protéine était extensible et particulièrement étendue aux endroits où les forces cellulaires sont les plus importantes, c'est-à-dire en bordure d'une cellule étalée. De plus, son extension semble libérer des sites de phosphorylation provoquant une cascade de signalisation avec notamment l'activation de la GTPase Rap1 [Tamada *et al.* , 2004].

Dans le même ordre d'idée, [del Rio *et al.* , 2009] ont montré que la structure de la taline pouvait être étirée sous des forces physiologiques libérant ainsi des sites de fixation de la vinculine. Un tel mécanisme permettrait donc un renforcement direct des complexes d'adhésion.

Mais si ces protéines peuvent évidemment conduire à la croissance des adhésions régulée par la force, leur existence pourrait aussi expliquer l'adaptation des complexes adhésifs, voire de la cellule entière, à la rigidité du substrat. En effet, comme le montre la figure 1.29-C, le cytosquelette est alors connecté à deux ressorts en série, l'un représentant la protéine étirable, l'autre le substrat. Ainsi, si le substrat est mou, c'est lui qui va se déformer en présence de force ; au contraire, s'il est rigide, p130Cas sera étirée libérant ainsi des sites de phosphorylation. Ce phénomène pourrait donc expliquer pourquoi les adhésions sont plus allongées sur substrat dur que mou, mais il n'explique

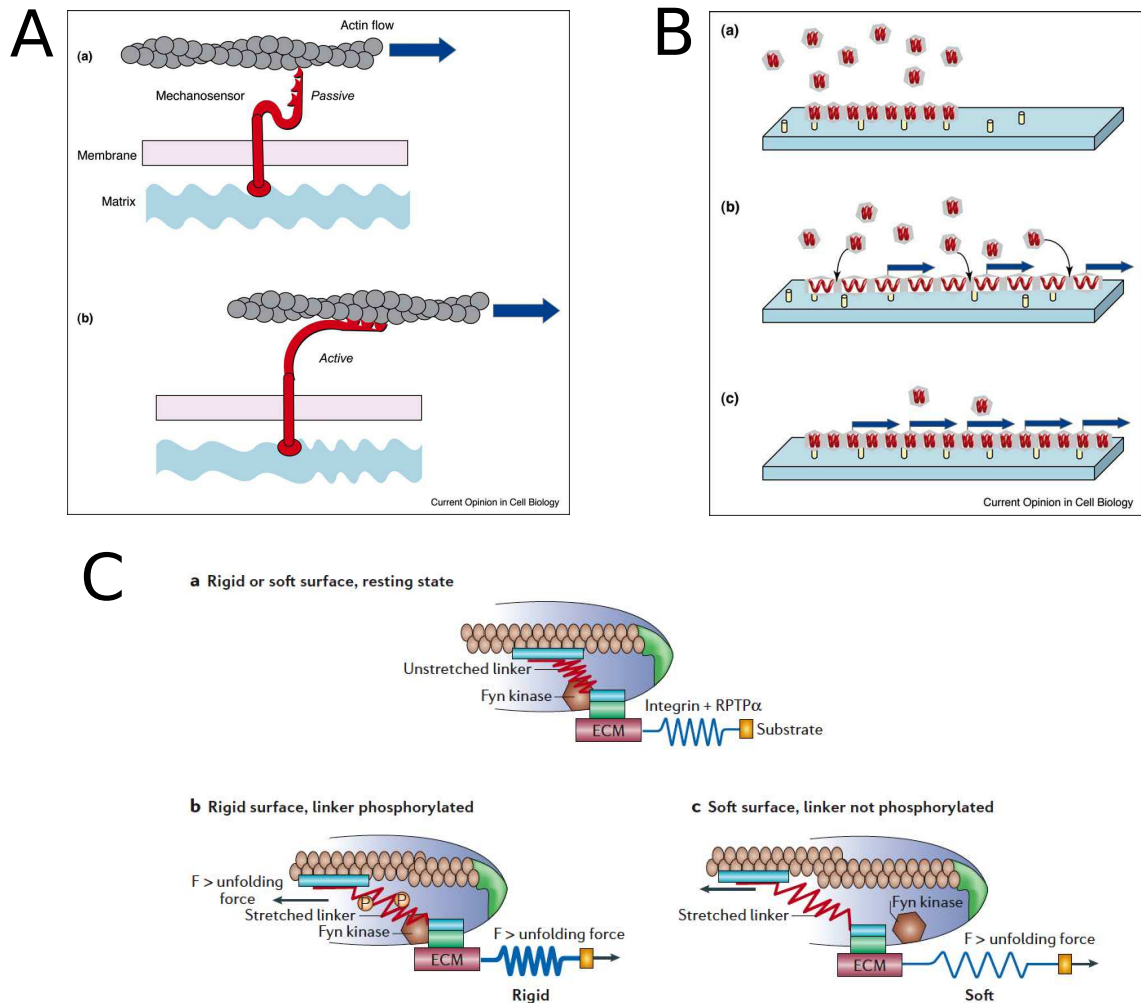


FIGURE 1.29 – A- Schéma inspiré de [Bruinsma, 2005] montrant le passage de l'état inactif à actif d'une protéine mécanosensible présente dans les complexes d'adhésion. B- Schéma inspiré de [Shemesh *et al.*, 2005] montrant un modèle thermodynamique de croissance d'un complexe d'adhésion sous l'effet d'une force [Bershadsky *et al.*, 2006]. C- Schéma montrant la déformation d'une protéine mécano-sensible des complexes d'adhésion selon la rigidité du substrat [Vogel & Sheetz, 2006].

pas l'adaptation instantanée de la force de traction à la rigidité.

Un autre modèle explique la mécano-sensibilité des adhésions par des arguments thermodynamiques [Shemesh *et al.*, 2005]. Ici, l'étirement d'un début d'agrégat sous l'effet de l'application de la contrainte crée à cet endroit une accumulation d'énergie élastique qui réduit le potentiel chimique des protéines jonctionnelles. Le recrutement de nouvelles protéines permet alors de relaxer cette contrainte (Fig 1.29-B). Ainsi, la croissance des adhésions serait causée par un auto-assemblage indépendant d'un quelconque changement de conformation.

Ouverture de canaux ioniques

Une autre hypothèse pour expliquer les phénomènes de mécano-sensibilité serait l'ouverture de canaux ioniques (K^+ , Ca^{2+} ,...). Bien que la manière dont ces canaux s'activent en réponse à un signal mécanique reste largement inconnue, deux hypothèses semblent défendables. Une première possibilité serait qu'une modification de l'état de la membrane (tension, viscosité) puisse impliquer des changements conformationnels des canaux [Vogel & Sheetz, 2006], tel qu'il l'a été montré pour les réponses aux chocs osmotiques chez les bactéries. Mais on peut également envisager une interaction mécanique avec le cytosquelette, dont la sollicitation, par exemple par un flux sanguin, pourrait aussi provoquer un changement de conformation du canal [Barakat *et al.*, 2006].

1.4.3 Régulation génétique à partir d'information mécanique

Nous avons décrit ci-dessus les mécanismes contrôlant la mécano-sensibilité des adhésions. Cette sensibilité peut avoir des effets directs sur l'architecture cellulaire en modulant les attaches de la cellule au substrat mais il est possible qu'elle possède des implications plus profondes encore.

Ainsi, un recensement récent a permis de montrer que plus de 900 protéines transitent par les sites d'adhésions [Kuo *et al.*, 2011]. Si l'on compare ce chiffre aux 20000 gènes que possède Homo Sapiens, on s'aperçoit que ces sites sont des centres de communication majeurs pour la cellule. De plus, au travers de ces protéines sont impliquées toutes les fonctions essentielles à la cellule : métabolisme, trafic, signalisation, machinerie ADN/ARN,... (Fig 1.30-A). Enfin, chose très importante, la présence de plus de la moitié de ces protéines au sein des adhésions est dépendante de la contractilité acto-myosine. Ainsi, la tension interne (et donc probablement des facteurs mécaniques externes) peut avoir un impact sur des fonctions cellulaires globales, ce qui pourrait expliquer par exemple la différenciation orientée des cellules souches suivant la rigidité de leur substrat.

Un exemple caractéristique d'une telle régulation implique la paxilline, un des composants essentiels des adhésions et dont la localisation est donc plus ou moins cytoplasmique. [Woods *et al.*, 2002] ont en effet montré que la paxilline peut transiter par le noyau et même participer au transport de l'ARN vers le réticulum endoplasmique. Ainsi, il est possible qu'une régulation de la taille des adhésions par des paramètres mécaniques pourrait indirectement influencer la fonction de la paxilline en tant que transporteur d'ARN.

Cependant, on peut aussi imaginer que des facteurs mécaniques influencent l'expression génétique de manière beaucoup plus directe. Par exemple, [Versaavel *et al.*, 2012] ont cultivé des cellules endothéliales sur des substrats de surface constante mais de forme de plus en plus allongées et ont montré de cette manière que le volume nucléaire diminue avec l'élongation de la cellule, ce qui affecte la compaction de la chromatine. De manière concomitante, le taux de division est aussi largement diminué sur des cellules allongées, preuve qu'une fonction complexe et fondamentale comme la mitose peut être influencée par ces changements de forme et de tension cellulaire (Fig 1.30-B).

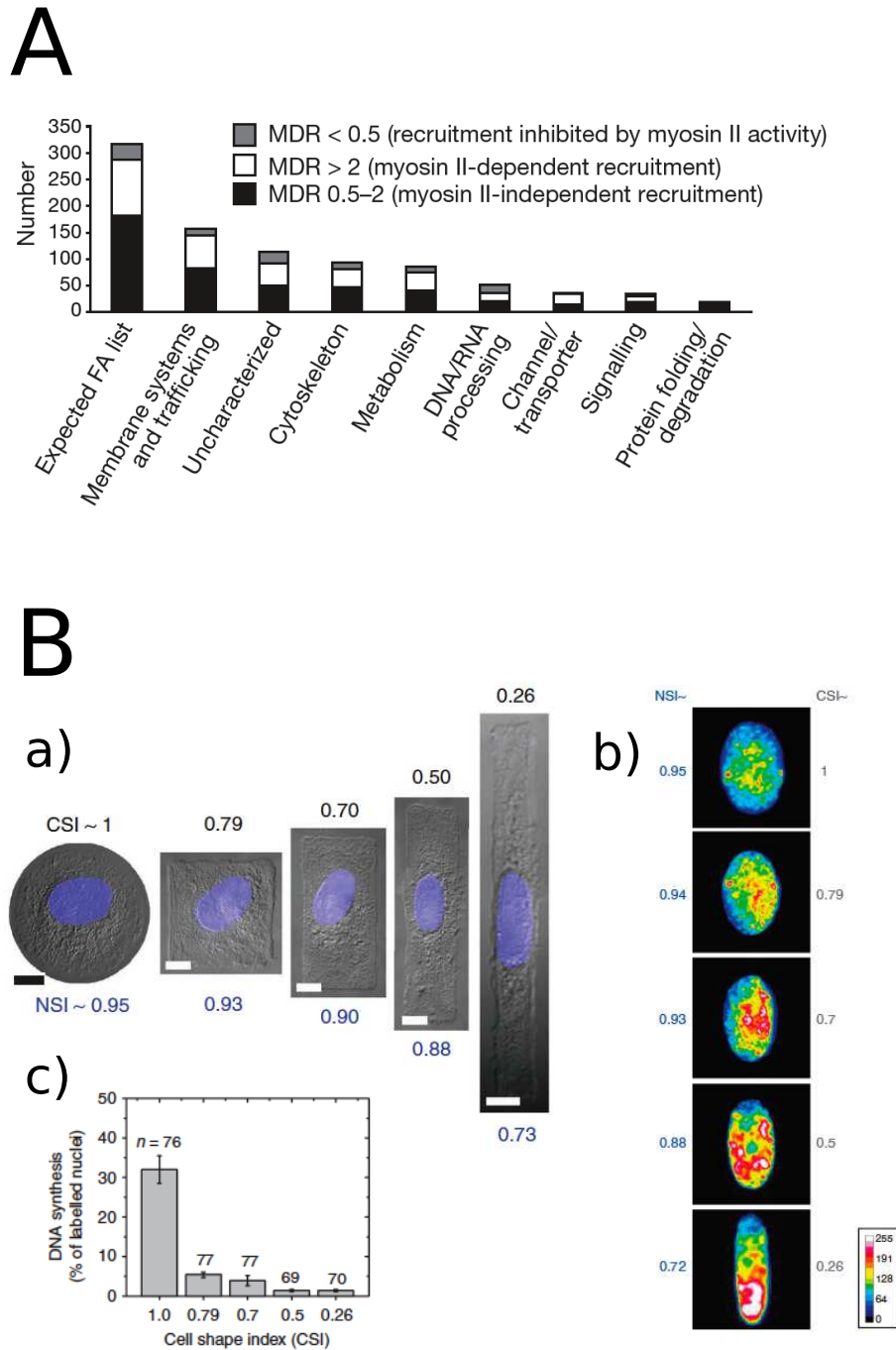


FIGURE 1.30 – A- Graphe montrant le nombre de protéines impliquées dans les complexes d'adhésion selon leur fonction [Kuo *et al.* , 2011]. B- a) Cellules endothéliales déposées sur des motifs adhésifs de rapport d'aspect variable. Le noyau apparaît en bleu. CSI = Cell Shape Index, NSI=Nucleus Shape index. b) Compaction de la chromatine en fonction de la forme du noyau et de la cellule. c) Graphe montrant la synthèse d'ADN, signe d'activité mitotique, en fonction de la forme cellulaire [Versaevel *et al.* , 2012].

1.4.4 Vers une vision intégrée de la mécano-transduction

Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'influence de l'environnement mécanique sur la vie des cellules animales. Premièrement, ces effets peuvent être dus à des facteurs purement physiques, à savoir la réponse complexe du cytosquelette contractile d'acto-myosine aux forces externes ou ses interactions avec le substrat qu'il peut déformer. Mais ces mécanismes ne peuvent expliquer que les réponses aux temps courts ou bien celles mettant en jeu l'architecture cellulaire. C'est pourquoi, pour comprendre l'ensemble des phénomènes d'adaptations mentionnés en 1.3, y compris ceux mettant en jeu des fonctions plus intégrées, il faut envisager des facteurs que l'on pourrait appeler *mécano-biochimiques*, comme le dépliement de protéines ou la compaction de la chromatine en réponse à des contraintes mécaniques. Cependant, en réalité, il est fort probable que tous ces facteurs marchent de manière synergique pour permettre une réponse intégrée des cellules.

Notre groupe a récemment proposé un modèle allant dans ce sens afin d'expliquer la polarisation des cellules en réponse à une anisotropie de rigidité du substrat telle qu'observée par [Saez *et al.* , 2007]. En effet, on sait que les cellules ont tendance à tirer plus fort sur un substrat dur que sur un substrat mou et que cette réponse est quasi-instantanée à cause de l'action du cytosquelette d'acto-myosine. Aussi, une cellule se posant sur un substrat anisotrope en rigidité sera instantanément polarisée mécaniquement. Ensuite, il est fort probable que cette polarisation mécanique résulte en une polarisation du système adhésif étant donné que la croissance des adhésions naissantes est dictée par la force qui s'applique sur elles. Par conséquent, les adhésions orientées dans la direction de faible rigidité auront tendance à disparaître au profit de celles orientées dans la direction de grande rigidité, créant ainsi une polarisation chimique globale dans toute la cellule (voir Fig 1.31). Des données expérimentales allant dans ce sens ont récemment été proposées par [?], qui observèrent la polarisation spontanée de fibroblastes sur des substrats de rigidités variables.

De plus, nous avons vu plus haut que l'allongement des cellules pouvait à lui seul induire des modifications profondes de la physiologie cellulaire à travers une compaction de la chromatine ou un changement du taux de division. Mais cet allongement cellulaire, qui est ici contrôlée par l'expérimentateur, pourrait être le fait d'une anisotropie du tissu *in vivo*. Alors, une telle anisotropie du milieu mécanique pourrait créer une réaction en chaîne impliquant des réponses à différentes échelles, à commencer par le cytosquelette d'acto-myosine, puis les complexes d'adhésion et enfin le noyau.

De même, la différenciation des cellules souches guidées par la rigidité de leur substrat pourrait être due en premier lieu à une réponse du cytosquelette contractile qui se répercuterait ensuite sur la croissance des adhésions et la signalisation partant de ces points pour aller jusqu'au noyau, le fait que l'inhibition de la myosine annule la différenciation en est la preuve.

Par ailleurs, une étude a récemment été réalisée par [Na *et al.* , 2008] qui souligne l'activité conjuguée du cytosquelette à l'échelle globale et de la mécano-sensation à l'échelle locale. Ici, les auteurs placèrent une bille à la surface d'une cellule de muscle lisse, puis appliquèrent une force sur cette bille à l'aide d'une pince magnétique. Ils regardèrent ensuite par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) l'ac-

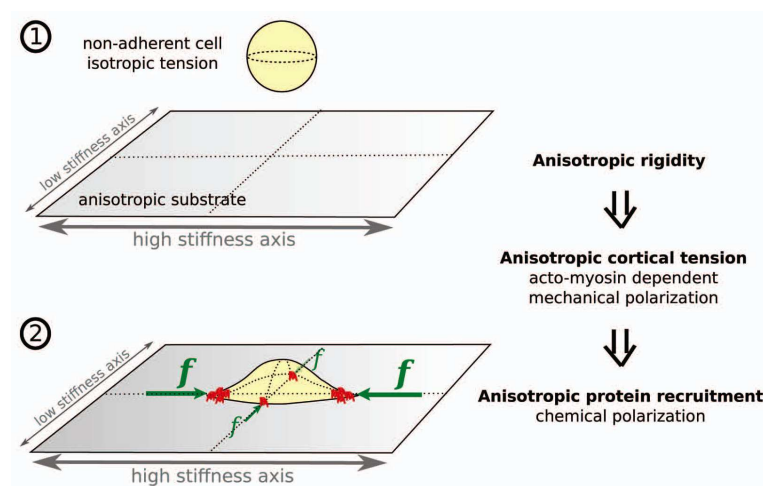


FIGURE 1.31 – Modèle expliquant la polarisation d'une cellule en réponse à un environnement de rigidité anisotrope [Fouchard *et al.* , 2011].

tivation de Src, une kinase généralement impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, ils purent observer que Src est activé en moins de 0,3 seconde dans plusieurs endroits de la cellule *a priori* distribués aléatoirement, souvent éloignés du point d'application de la force (Fig 1.32-A). En outre, cette réponse nécessite que la bille soit liée à la membrane par l'intermédiaire des intégrines, mais aussi que le cytosquelette d'actine et de microtubules soit intact.

Or, une réponse délocalisée aussi rapide ne peut être interprétée que comme le résultat d'un transfert d'énergie mécanique à travers tout le cytosquelette qui est, dans les conditions normales, tendu et donc mécaniquement connecté. Cette énergie mécanique est ensuite transformée en signaux chimiques probablement par l'activation de mécano-senseurs.

De plus, les auteurs comparent cette réponse mécanique à celle provoquée sur Src par le facteur de croissance EGF. La réponse induite par EGF n'est détectable qu'au bout de plusieurs secondes voire dizaine de secondes (Fig 1.32-B). Ceci suggère donc que les cellules peuvent percevoir des signaux émis à de grandes distances très rapidement, et ce grâce à leurs propriétés mécaniques, chose qui est plus difficilement imaginable avec les facteurs solubles dont la diffusion est lente et souvent limitée par la densité du milieu.

Mécanique et facteur de croissance

Néanmoins, il ne faut pas négliger l'importance de ces facteurs solubles dans nos études sur la mécanotransduction. D'une part, car ils participent au contrôle des fonctions mécaniques, par exemple en influant sur la production de matrice extracellulaire [Blatti *et al.* , 1988] ou encore en activant les protéines de signalisation Rho et Rac qui sont connues pour jouer un grand rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine [Ridley *et al.* , 1992a,b].

D'autre part, car ces facteurs semblent interférer avec les voies de signalisation associées aux facteurs mécaniques. Ainsi, il est possible que certains récepteurs des facteurs

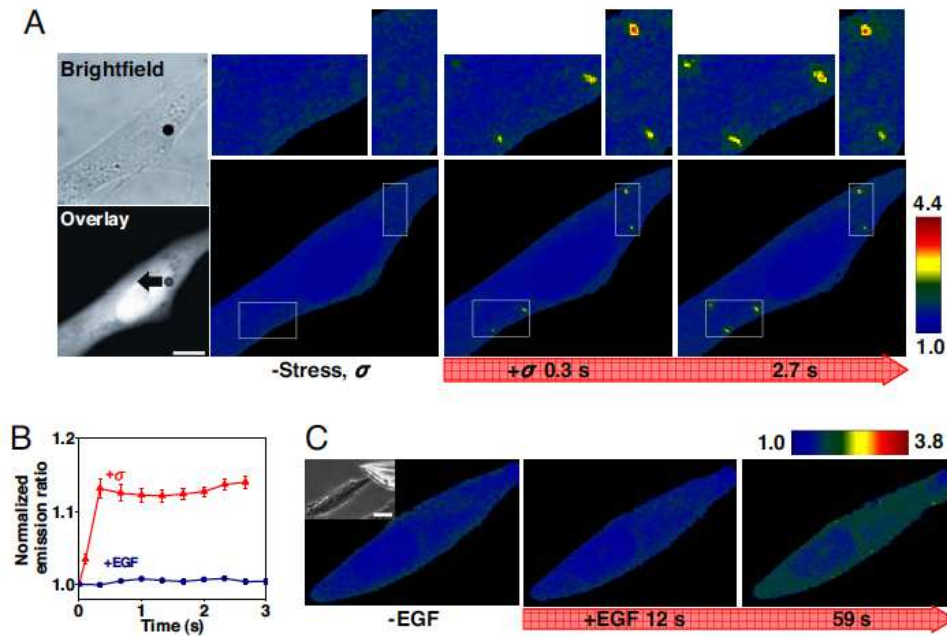


FIGURE 1.32 – A- Signal d’activation FRET de la protéine Src en réponse à une contrainte localisée appliquée via une bille magnétique (en noir, images de gauche). Les spots de couleur indiquent l’activation de Src à distance. B- Comparaison avec l’activation de Src provoqué par la diffusion du facteur de croissance EGF [Na *et al.* , 2008]

de croissance situés dans la membrane puissent activer des voies de signalisation sans la présence de leur facteur soluble associé mais simplement en formant des clusters avec l’intégrine [Yamada & Even-Ram, 2002]. Par ailleurs, la kinase FAK est soupçonnée de pleinement promouvoir la signalisation des processus de migration lorsqu’elle se lie d’un côté aux protéines adaptatrices des adhésions et d’un autre côté aux récepteurs des facteurs de croissance (PDGF, EGF,...) [Sieg *et al.* , 2000].

C’est pourquoi, comme le préconisent [Discher *et al.* , 2009], il devient aujourd’hui nécessaire de prendre en compte à la fois les micro-environnements chimique *et* mécanique des cellules - notamment des cellules souches - si l’on veut un jour pouvoir comprendre et maîtriser leur fonctionnement.

1.5 Conclusions du chapitre et objectifs de la thèse

Comment des facteurs mécaniques peuvent-ils influencer la physiologie d'une cellule animale ? Cette question est évidemment de nature fondamentale, mais si des réponses pouvaient être formulées, elles pourraient très vite déboucher sur de nombreuses applications (thérapie à base de cellules souches, cancer, bioingénierie tissulaire,...). En tentant de répondre à cette question, ce premier chapitre a mis le doigt sur plusieurs points qui restent encore très flous dans la littérature. Dans la suite de cette thèse, nous nous focaliserons sur deux d'entre eux, qui sont intimement connectés.

Le premier problème concerne la forme que prend une cellule dans un environnement donné. Nous avons vu que l'acteur principal dans ce processus est le cytosquelette d'actine. Celui-ci participe à un mouvement d'extension de la cellule en formant des protrusions (lamellipode, filopode) qui poussent la membrane à l'avant de la cellule. D'un autre côté, l'actine forme avec la myosine des structures contractiles à l'échelle cellulaire (cortex, fibres de stress). L'actine participe ainsi à la mise sous tension de la structure cellulaire de deux manières à la fois, d'une part en étendant la structure avec cette activité protrusive, d'autre part en rendant effective cette tension et, en quelque sorte, en la pérennisant grâce aux liens formés avec la myosine. A la jonction de ces deux réseaux, les complexes d'adhésion encaissent les forces tensiles et fixent, pour un moment au moins, la forme prise par la cellule.

Tous ces acteurs (actine, myosine et adhésions²²) sont donc intimement connectés dans l'espace et dans le temps ; en effet, l'apparition de ces structures est également interdépendante. Malgré de très nombreuses études sur le sujet (qui tentèrent des approches aussi bien biologique que biophysique) un tas de questions fondamentales restent encore aujourd'hui en suspens. Par exemple, on peut très bêtement se demander pourquoi une cellule s'étale jusqu'au moment où elle ne s'étale plus ? Autrement dit, qu'est-ce qui fait que la tendance protrusive domine pendant l'étalement ? Cette question n'est pas résolue. Ou encore, comment se coordonnent la formation des complexes d'adhésion et des structures tensiles pour permettre l'émergence d'une forme globale ou de phénomènes de motilité ?

La première partie des résultats présentés dans cette thèse apportera quelques prémisses de réponses à ces questions. Pour cela, nous nous intéresserons à un phénomène modèle : l'étalement précoce de fibroblastes Ref-52 dans lesquels une protéine des complexes adhésifs, la paxilline, est fusionnée à la protéine fluorescente YFP. L'intérêt de ce phénomène est qu'il met en jeu de grands changements de forme cellulaire puisque la cellule, qui est sphérique au départ, prendra une forme très étalée en quelques dizaines de minutes ; de plus, comme nous le verrons, les structures adhésives et contractiles évoluent drastiquement entre le début et la fin du phénomène. Ces changements grossiers devraient donc nous permettre de tirer des conclusions peut-être plus facilement que si l'on étudiait par exemple une cellule en migration, où les régulations semblent beaucoup plus subtiles.

22. Les microtubules sont aussi probablement très importants pour la morphogénèse cellulaire, notamment parce qu'ils guident la polarisation ; cependant nous n'en parlerons pas du tout dans le reste de cette thèse puisque nous nous concentrerons sur des événements où la cellule garde une forme isotrope.

Ainsi, grâce à un dispositif de microscopie à ondes évanescentes, nous mettrons d'abord en parallèle la cinétique de l'étalement, qui nous renseignera sur la forme et l'activité protrusive de la cellule, et la dynamique de formation des agrégats de paxilline pendant ce processus (chapitre 2). Nous examinerons ensuite l'effet de la contractilité sur ces deux phénomènes par l'emploi de drogues inhibant la myosine. D'autre part, nous contraindrons la forme de la cellule grâce à l'utilisation de motifs adhésifs et observerons l'effet produit sur la formation des adhésions.

Ces différents points d'entrée nous conduiront à un scénario de la dynamique de l'étalement cellulaire, guidé en premier lieu par un paramètre géométrique (la forme du corps cellulaire) contrôlant la formation des adhésions et peut-être la polymérisation de l'actine.

Nous nous sommes alors interrogés sur les effets de l'environnement mécanique sur l'étalement cellulaire. Nous savons en effet que cet environnement influence la forme et l'architecture de ces cellules, *via* une adaptation coordonnée du cytosquelette d'actomyosine et des complexes d'adhésion.

Pour poursuivre dans cette voie, nous avons mis au point un dispositif couplant mesures de forces de traction cellulaires générées au cours de l'étalement et visualisation de la dynamique des complexes d'adhésion. Ce dispositif, que nous présenterons au chapitre 3, repose sur l'utilisation de micro-plaques de verre assez fines pour être défléchies par les cellules ; la mesure de cette déflexion couplée à la connaissance de la raideur de la micro-plaque permettent ensuite de remonter à la force de traction. Nous avons adapté ce dispositif sur le microscope à ondes évanescentes évoqué plus haut afin de caractériser l'étalement et la formation des complexes d'adhésion simultanément à la force de traction.

Ce dispositif aura pour nous deux avantages. D'abord, grâce à la mesure de la force de traction, il éclairera les résultats obtenus lors de la première partie auxquels il manquait une véritable mesure de l'activité contractile. Ainsi, nous pourrions mesurer dynamiquement sur une seule cellule, à la fois l'activité protrusive, l'activité contractile et la dynamique des complexes d'adhésion. D'autre part, ce dispositif permettra d'étudier l'influence de l'environnement mécanique sur tous ces paramètres en modifiant la raideur ressentie par les cellules lors de la traction, y compris en temps réel grâce à un dispositif de rétroaction. Au passage, l'environnement géométrique sera aussi changé par rapport à la première partie puisque la cellule adhérerait alors à deux plaques simultanément et non plus à une seule. Il sera alors intéressant de comparer la cinétique de l'étalement et l'organisation des adhésions dans les deux géométries, c'est ce que nous ferons dans le chapitre 4.

CHAPITRE 2

Cinétique de l'étalement sur substrat plan, forme cellulaire et formation des complexes d'adhésion

Sommaire

2.1	Contexte particulier : Étalement précoce de cellules animales . .	71
2.1.1	Éléments expérimentaux	71
2.1.2	Approches physiques	75
2.1.3	Approches biologiques	76
2.1.4	Approche intermédiaire	77
2.2	Résultats expérimentaux	79
2.2.1	Procédure expérimentale et méthode d'analyse	79
2.2.2	Cinétique du rayon cellulaire	80
2.2.3	Dynamique des complexes d'adhésion	82
2.2.4	Corrélation entre cinétique de l'étalement et formation des complexes d'adhésion	85
2.2.5	Seuil d'apparition des adhésions - Angle de contact du corps cellulaire	87
2.2.6	Effet de la tension interne sur l'étalement et la dynamique des complexes d'adhésion	90
2.2.7	Effet de la spécificité du substrat et de la densité de ligands	94
2.2.8	Morphologie de la membrane au cours de l'étalement	97
2.3	Discussion et perspectives	99
2.3.1	Vers un modèle intégré de l'étalement cellulaire	99
2.3.2	Perspectives	102

L'étalement des cellules animales est un phénomène intéressant à plus d'un titre. Premièrement parce que ce phénomène intervient dans certaines fonctions de la physiologie animale. Ainsi, les cellules du système immunitaire comme les macrophages sont rondes lorsqu'elles circulent dans les vaisseaux sanguins puis elles s'étalent sur la paroi de ces vaisseaux avant de pénétrer les tissus infectés. D'autre part, afin de reprendre une forme normale après la mitose, toutes les cellules s'étalent après s'être décollées pour se diviser¹, c'est ce qu'on appelle l'étalement post-mitotique.

Mais l'étalement est également intéressant car il s'approche fortement de la migration, phénomène de première importance pour nombre de fonctions et pathologies dans les organismes animaux. Or, l'étalement comme la migration mettent en jeu l'avancée d'un front d'actine régulé par d'autres acteurs comme la contractilité acto-myosine et les complexes d'adhésion. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, comprendre la manière dont ces régulations s'articulent est de manière générale très important, notamment pour appréhender les phénomènes de morphogénèse cellulaire.

Enfin, même si ceci est lié aux raisons précédemment citées, l'étalement est d'un intérêt tout particulier pour notre équipe puisque les expériences de force de traction cellulaire réalisées à partir du rhéomètre à cellule unique ont montré que cette force ne pouvait être produite sans un étalement du corps cellulaire sur les plaques [Mitrossilis *et al.* , 2009]. Ainsi, comprendre la manière dont une cellule s'étale devrait nous aider à comprendre la manière dont elle applique des forces de traction, et réciproquement.

Cependant, nous verrons dans la première section de ce chapitre que l'étalement cellulaire, que l'on peut imaginer comme un phénomène simple au premier abord, est en fait très complexe. Aussi peut-on l'envisager de plusieurs points de vue selon l'interprétation que l'on fait des données, qui peuvent parfois sembler contradictoires.

Afin de résoudre ces contradictions et de comprendre en profondeur ce phénomène, nous avons cherché à le décrire de la manière la plus complète possible en caractérisant la corrélation entre changement de forme de la cellule (corps et lamelle y compris) et formation des complexes d'adhésion. Puis nous avons étudié l'effet de la tension corticale et de la densité de ligands déposés en surface sur l'étalement. Nous présenterons les résultats de ces expériences dans la deuxième section de ce chapitre.

Ces résultats nous ont conduits à formuler un scénario de l'étalement qui résout une partie des contradictions évoquées plus haut. Nous présenterons ce scénario dans la troisième section de ce chapitre.

1. Toutefois, dans ce cas, de fines fibres d'actine appelées *fibres de rétraction* restent collées au substrat lorsque les cellules s'arrondissent pour faire la mitose.

2.1 Contexte particulier : Étalement précoce de cellules animales

2.1.1 Éléments expérimentaux

Quasiment depuis l'invention de la culture cellulaire en laboratoire, les chercheurs s'interrogent sur la façon dont s'étaient les cellules animales sur un substrat plan. Ainsi retrouve-t-on des études à ce sujet dès les années 1960 [Taylor, 1961]. Si l'interprétation et le détail de plusieurs observations expérimentales sont encore aujourd'hui beaucoup discutées, on peut toutefois s'accorder sur un schéma global de la façon dont se déroule le phénomène.

Avant toute chose, il faut préciser qu'afin d'observer leur étalement, les cellules en culture sont d'abord isolées de leur substrat, la plupart du temps à l'aide de trypsine. La trypsine est une enzyme qui va ici servir à digérer par hydrolyse les protéines transmembranaires faisant le lien avec le substrat. Les cellules vont alors se détacher et prendre une forme sphérique.

Intéressons-nous maintenant à l'article de [Bereiter-Hahn *et al.*, 1990], qui fait une description précise du processus d'étalement de cellules XTH-2, dérivées de cellules endothéliales de xénope.

Après avoir sédimenté, les cellules encore rondes stagnent un moment au niveau du substrat et laissent apparaître quelques blebs, puis elles lancent des filopodes dans des directions aléatoires, filopodes qui vont servir de guide pour une extension du cytoplasme dans ces directions (Fig 2.1-A, à gauche). Le corps cellulaire est alors rond et entouré d'un cortex d'actine (Fig 2.1-B, à gauche) ; la membrane à sa surface forme de nombreux microvillus. En continuant son extension sur le substrat, la cellule laisse apparaître un feuillet lamellaire fin et lisse contenant de l'actine filamentueuse (Fig 2.1-A, au centre).

Dans une deuxième phase, la distinction entre le corps cellulaire et la lamelle disparaît. Le profil cellulaire ne montre alors plus de point anguleux, l'apparition de fibres de stress circulaires en périphérie souligne néanmoins la transition entre les deux structures (Fig 2.1-B et C). Enfin, autre changement, la surface du corps cellulaire devient alors lisse.

D'autre part, les auteurs notent deux choses qui pourront nous intéresser pour la suite. Premièrement, la proportion d'actine filamentueuse dans la cellule augmente avec l'aire d'étalement. Ceci ne signifie pas nécessairement que la polymérisation de l'actine génère la force à l'origine de l'étalement mais cela en fait une sérieuse hypothèse de travail. Deuxièmement, une forte consommation d'ATP est remarquée dans la deuxième phase, mais pas dans la première. Pour expliquer cette observation, les auteurs proposent plusieurs hypothèses parmi lesquelles la contraction des filaments acto-myosine.

Ces quelques données nous montrent que les acteurs responsables de la morphogénèse cellulaire et de la mécano-sensibilité (membrane plasmique, cytosquelette d'acto-myosine, adhésions) interviennent aussi au cours de l'étalement cellulaire. Ainsi, la membrane plasmique et l'organisation de l'actine subissent de grands changements qui semblent coordonnés, la formation de fibres de stress étant synchronisée avec le lissage de la membrane plasmique. De plus, il est très intéressant de noter que ces deux événements coïncident avec un changement de forme du corps cellulaire.

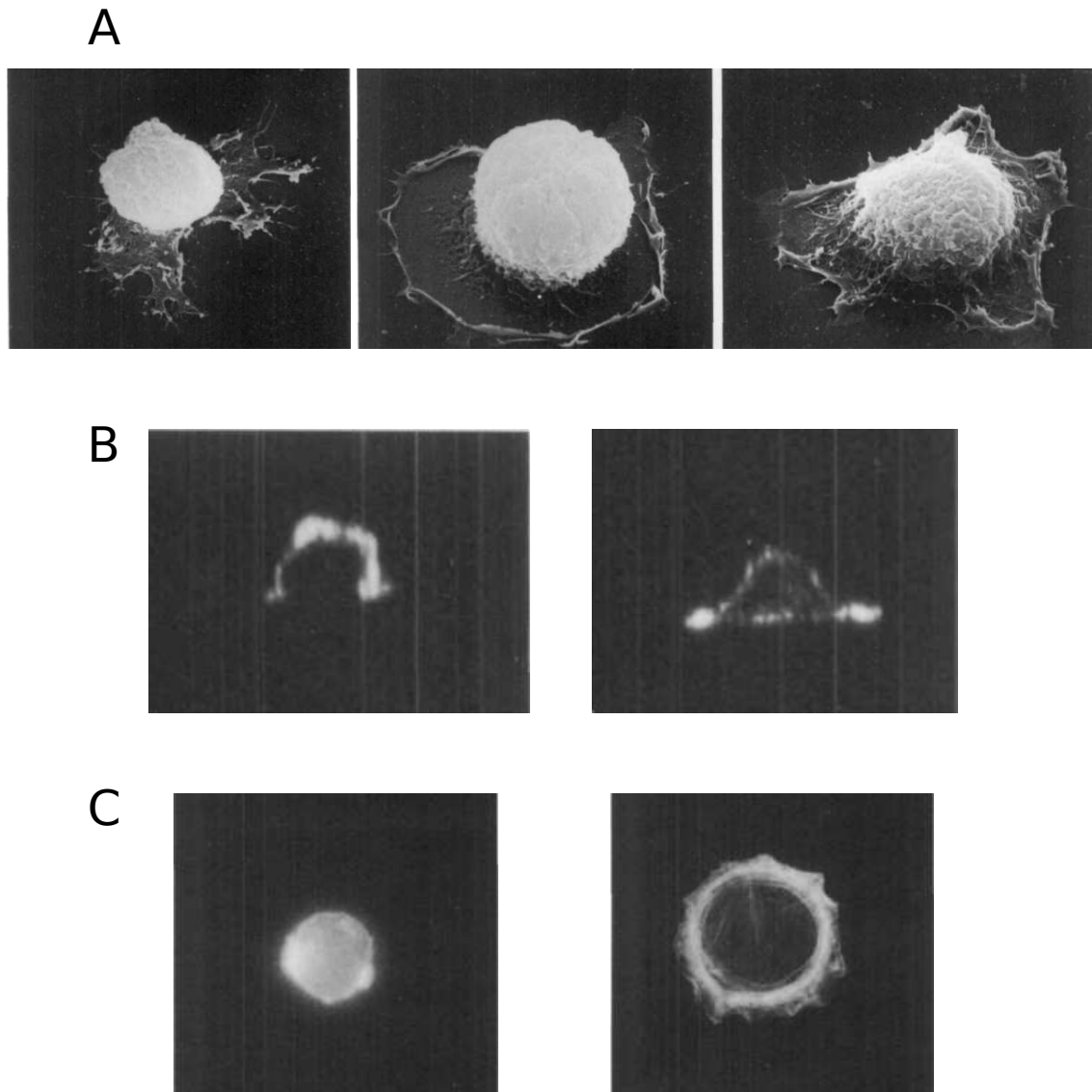


FIGURE 2.1 – A- Images en microscopie électronique de cellules XTH-2. De gauche à droite, les étapes successives de l'étalement. B- Cellules de profil reconstruites à partir d'images en microscopie confocale, avant (à gauche) et après (à droite) fusion de la lamelle avec le corps cellulaire. L'actine est marquée à la phalloïdine. C- Coupe au niveau du contact cellule-substrat des mêmes événements [Bereiter-Hahn *et al.* , 1990].

Enfin, si [Bereiter-Hahn *et al.* , 1990] ne traitent pas des adhésions dans leur article, d'autres études plus tardives ont montré qu'une couronne d'adhésions relie les fibres de stress formées lors de la deuxième phase de l'étalement (Fig 2.4-A), ce qui rappelle le lien entre adhésions et fibres de stress évoqué au chapitre 1.

Au delà de ces travaux fondateurs sur cellules fixées, plusieurs études se sont récemment penchées sur la cinétique de l'étalement en observant précisément le contact cellule-substrat au cours du temps. Ainsi, 3 phases bien distinctes ont pu être mises en évidence.

Au cours de la première phase, la cellule s'étale très faiblement. La durée de cette phase, qui rappelle la phase de stagnation observée par [Bereiter-Hahn *et al.* , 1990], correspond effectivement à la période durant laquelle les cellules font des blebs, période dont la durée est inversement proportionnelle au temps pendant lequel les cellules sont laissées en suspension après décollement [Norman *et al.* , 2010]. Toutefois, ce temps de stagnation peut aussi dépendre de la quantité de fibronectine adsorbée sur le substrat [Dubin-Thaler *et al.* , 2004].

L'étalement proprement dit s'opère en deux phases bien distinctes : une première phase où l'étalement est rapide suivie d'une phase plus lente qui apparaît après environ 300 secondes. Plusieurs études ont mis en évidence une loi de comportement du rayon de contact cellule-substrat en loi de puissance du temps, avec un exposant 0,5 pour la première phase et 0,25 pour la seconde [Döbereiner *et al.* , 2004; Cuvelier *et al.* , 2007; Étienne *et al.* , 2011] (Fig 2.2-A et B). De plus, cette loi serait indépendante du type cellulaire et du type de contact formé (cadhérine-cadhérine, intégrine-fibronectine,...)[Cuvelier *et al.* , 2007]. Notons toutefois que ces études ont été réalisées, soit en l'absence de sérum [Cuvelier *et al.* , 2007; Döbereiner *et al.* , 2004] ce qui inhibe une grande partie de l'activité protrusive et contractile de la cellule et fait d'elle un objet proche d'une vésicule remplie d'actine, soit en prenant en compte seulement l'avancée du corps cellulaire et non la protrusion lamellaire [Étienne *et al.* , 2011].

Cependant, d'autres études, bien qu'observant aussi une phase d'étalement rapide suivie d'une phase plus lente, ont mis en évidence des temps caractéristiques soit beaucoup plus longs [Mooney *et al.* , 1995](Fig 2.2-C), soit beaucoup plus courts [Lam Hui *et al.* , 2012] (Fig 2.2-F). De plus, si l'aire finale est globalement conservée, elle est susceptible d'être modifiée par la densité de ligands en surface [Mooney *et al.* , 1995; Reinhart-King *et al.* , 2005]. Enfin, certains auteurs ont été amenés à ajuster leur données par des lois autres qu'une loi de puissance, de type exponentielle [Norman *et al.* , 2010] (Fig 2.2-D) ou tangente hyperbolique [Lam Hui *et al.* , 2012].

Ainsi, s'il semble globalement admis que l'étalement des cellules procède en trois temps (stagnation, étalement rapide, étalement lent), la cinétique exact de ce processus reste aujourd'hui controversée.

Par ailleurs, plusieurs visions théoriques du problème peuvent soutenir l'une ou l'autre des observations expérimentales. Ainsi, une cinétique en loi de puissance laisse penser que l'étalement est géré par les propriétés du matériau cellule, tandis qu'une aire finale d'étalement dépendant de la densité de ligands a tendance à plaider pour un processus dépendant de la signalisation intégrine-dépendante. Détaillons maintenant ces différentes approches afin d'évaluer leurs points forts et leurs faiblesses.

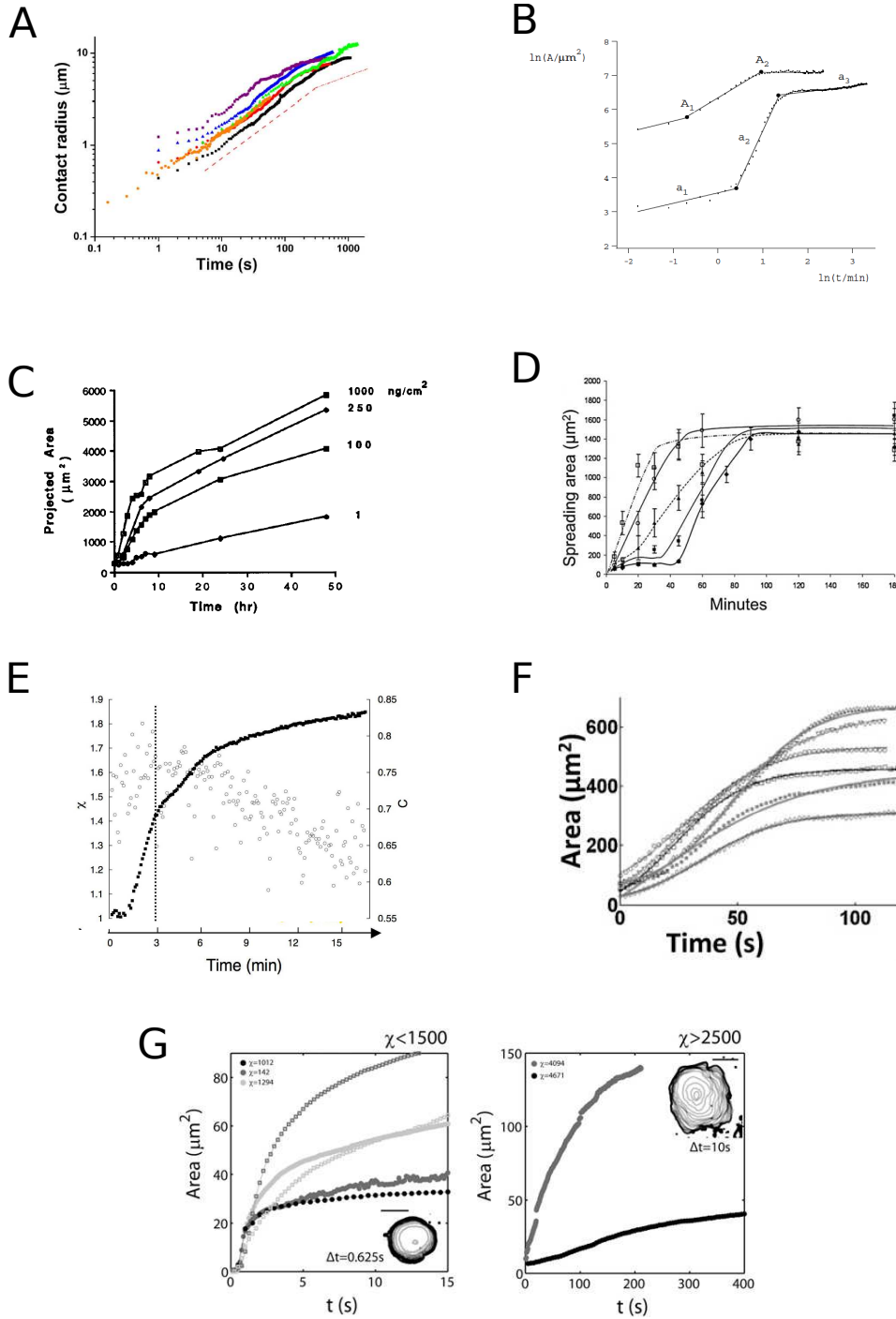


FIGURE 2.2 – Cinétiques d'étalement obtenus dans différents articles. Nous indiquons à la suite le type cellulaire et la méthode d'observation. A- HeLa, S180 (sarcome) ; RICM [Cuvelier *et al.* , 2007]. B- Fibroblastes ; TIRF [Döbereiner *et al.* , 2004]. C- Hépatocytes ; microscopie à transmission [Mooney *et al.* , 1995]. D- Cellules endothéliales ; TIRF [Norman *et al.* , 2010]. E- Fibroblastes ; DIC [Fardin *et al.* , 2010]. F- Lymphocytes T (Jurkat) ; Interférence RM [Lam Hui *et al.* , 2012]. G- Système vésiculaire biomimétique ; RICM [Murrell *et al.* , 2011].

2.1.2 Approches physiques

Suite aux mesures montrant une cinétique universelle en loi de puissance, [Cuvelier *et al.* , 2007] développèrent un modèle purement physique où ils modélisent la cellule par une vésicule géante entourée d'un cortex d'actine. En s'étalant la cellule gagne en énergie d'adhésion, énergie qui est compensée par une dissipation visqueuse à l'intérieur du cortex. Les deux phases de l'étalement correspondent alors à des géométries différentes de la cellule. Dans la première phase, la dissipation a lieu dans un volume égal à l'aire de contact cellule-substrat multiplié par l'épaisseur du cortex. L'explication de la deuxième phase est quant à elle beaucoup plus surprenante. Les auteurs se basent sur le fait que la transition entre les deux phases a lieu lorsque le rayon de contact est environ égal au rayon initial de la cellule. Ils avancent alors l'idée que dans ce cas, la cellule est très aplatie; ainsi la dissipation aurait lieu à l'intérieur de l'ensemble du volume cellulaire qui serait occupé en grande part par le cortex, ce qui expliquerait la loi de puissance avec l'exposant 0,25. Cependant, une telle description géométrique semble peu réaliste; en effet, si l'on suppose une conservation du volume, il est difficile d'imaginer la cellule (dont le diamètre initial vaut $15\ \mu m$) prendre la forme d'un cylindre de diamètre égal au diamètre initial et dont l'épaisseur serait de quelques micromètres (un peu plus de deux fois l'épaisseur du cortex). Les images présentées dans l'article montrent d'ailleurs bien que la cellule est encore très haute lorsque le rayon de contact atteint la transition.

[Murrell *et al.* , 2011] ont quant à eux choisi de prendre une approche *bottom-up* pour étudier ce problème. Ils ont en effet pu fabriquer des cortex d'actine biomimétiques à l'intérieur de liposomes comprenant toute la machinerie nécessaire à la polymérisation de l'actine (Arp2/3, ADF/coffiline, ATP,...). La cinétique de l'étalement de ces objets s'est révélée assez similaire à celle observée chez les cellules, avec une phase d'étalement rapide suivie d'une phase plus lente avant d'atteindre l'équilibre (Fig 2.2-G). Cette cinétique est ici aussi interprétée comme résultant d'un gain d'énergie d'adhésion (déduite de l'angle de contact au travers de la loi d'Young) compensé par une dissipation visqueuse.

[Étienne *et al.* , 2011] ont aussi cherché à approfondir cette idée. Pour cela, ils ont rigoureusement modélisé l'écoulement de deux fluides visqueux l'un dans l'autre en considérant plusieurs types d'objets pour représenter la cellule (goutte visqueuse, goutte composite avec une coque très visqueuse, vésicule). Ils trouvèrent comme [Cuvelier *et al.* , 2007] que la goutte complexe décrit bien le comportement en $t^{0.5}$ observé lors de la première phase. Les auteurs font d'ailleurs la remarque que ce comportement est indépendant de la force responsable de l'étalement (énergie d'adhésion, polymérisation de l'actine,...) ce qui ne résout pas le problème. De plus, ce modèle est en accord avec leur observation expérimentale selon laquelle la transition entre les deux phases s'opère lorsque l'aire de contact entre le corps cellulaire et le substrat vaut environ 0,9 fois la section initiale de la cellule. Toutefois, ce modèle échoue à expliquer la transition de régime et la suite de l'étalement, c'est-à-dire le comportement lors de la deuxième phase.

[Norman *et al.* , 2010] ont tenté de décrire cette phase en ajoutant un terme d'énergie élastique qui s'opposerait à l'énergie d'adhésion vers la fin de l'étalement. Ce terme

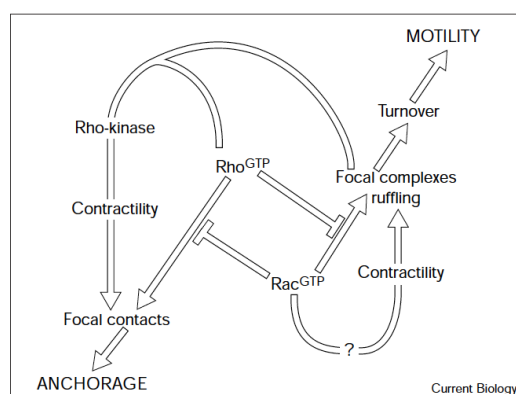


FIGURE 2.3 – Schéma d'interactions initiées par Rho et Rac décrivant la transition entre ancrage et motilité chez des fibroblastes [Rottner *et al.* , 1999]

serait lié selon eux à la réduction du nombre d'accroches entre le cortex et la membrane au fur et à mesure de l'étalement.

2.1.3 Approches biologiques

Nous décrivons ici des approches plus biologiques, dans le sens où elles cherchent à décrire le rôle de chacun des acteurs du phénomène et de leurs interactions.

Tout d'abord, [Price *et al.* , 1998] firent l'observation que des fibroblastes s'étaient plus sur fibronectine que sur poly-L-lysine - l'aire d'adhésion étant multipliée par quatre après 60 minutes - en l'absence de sérum donc de facteurs de croissance. Ils observèrent également que l'étalement est inhibé chez les cellules portant des mutants des GTPases Rac et Cdc42. Or, ces protéines sont connues pour être à l'origine de la formation des filopodes et lamellipodes lorsqu'elles sont activées par des facteurs de croissance [Ridley *et al.* , 1992a; Nobes & Hall, 1995]. Ceci suggère donc que le processus d'étalement dépend du contact intégrine-fibronectine, lequel serait à l'origine de la polymérisation de l'actine via Rac et Cdc42.

Par ailleurs, la protéine Rho semble jouer un rôle dans la formation des fibres de stress et des adhésions en réponse aux facteurs de croissance [Ridley *et al.* , 1992b]. Aussi, les interactions d'inhibitions réciproques qu'elle possède avec Rac [Rottner *et al.* , 1999] pourraient expliquer la motilité cellulaire comme l'étalement. Toutefois, le modèle proposé semble quelque peu alambiqué (Fig 2.3).

De manière générale, si elles nous renseignent précisément sur les acteurs impliqués, ce genre d'études peuvent difficilement aider à quantifier des phénomènes tels que la cinétique de l'étalement. Il faudrait pour cela avoir accès à la dynamique spatio-temporelle des réactions chimiques mises en jeu, ce qui est aujourd'hui encore inimaginable.

Un autre type d'approche est d'observer l'organisation des différentes structures au cours du temps grâce à l'utilisation de la microscopie de fluorescence. Une étude à ce sujet est particulièrement intéressante pour nous puisqu'elle cherche à comprendre l'étalement en regardant la formation de complexes d'adhésion. Ainsi, en observant la formation de complexes de ce type au bout de filopodes, [Partridge & Marcantonio,

2006] proposèrent que l'étalement soit initié par ces structures qui serviraient de points d'ancrage à l'avancée du reste du cytoplasme.

Ils observent par ailleurs que l'intégrine et la taline sont toujours colocalisées et ce dès l'apparition de ces structures ; la paxilline et FAK colocalisent quant à elles avec l'intégrine dans 70% des cas, tandis qu'il existe un délai de 60 à 90 secondes (temps correspondant à l'intervalle entre les prises d'images) dans les 30% restants. Par la suite, ces complexes d'adhésion servent de points d'ancrage aux fibres d'actine qui commencent à se former 15 minutes après le début de l'étalement (Fig 2.4-A). [Senju & Miyata, 2009] ont par ailleurs montré que ces fibres contiennent de la myosine II et qu'elles accompagnent le changement de forme des cellules lors de leur polarisation (Fig 2.4-B).

2.1.4 Approche intermédiaire

Le laboratoire de M.P. Sheetz a fourni une vision de l'étalement un peu intermédiaire entre celles présentées ci-dessus. Malgré une production pléthorique et parfois contradictoire, on peut dégager de ce travail un schéma global qui serait le suivant.

Selon [Dubin-Thaler *et al.* , 2004], la phase de stagnation dépend de la quantité de contact cellule-matrice qui initie la polymérisation de l'actine à plus ou moins long terme. Une fois l'étalement engagé, la force motrice du processus pendant la première phase serait due à la polymérisation de l'actine et non pas à un gain d'énergie d'adhésion. [Fardin *et al.* , 2010] ont ainsi proposé une théorie hydrodynamique en partant du calcul des contraintes dues à la polymérisation contre la membrane ; [Xiong *et al.* , 2010] ont eux aussi pu reproduire ces observations expérimentales mais à partir de simulations moléculaires du processus de polymérisation.

Par ailleurs, la vision offerte de la deuxième phase de l'étalement est plus biologique. En effet, [Zhang *et al.* , 2008] ont montré que les cellules dont la taline a été supprimée par ARNi se rétractent en entrant dans cette deuxième phase ; cette observation est synonyme d'un besoin de former des contacts matures transmettant des forces au substrat pour pouvoir poursuivre l'étalement. Mais [Gauthier *et al.* , 2011] ont montré que le nombre d'événements d'exocytose augmente drastiquement à l'entrée dans la seconde phase d'étalement, ce qui suggère l'existence préalable d'un réservoir de membrane qui s'épuiserait et laisserait place à un autre régime où l'aire cellulaire s'accroîtrait par exocytose. Néanmoins, les auteurs ne commentent pas les mécanismes qui pourraient être à l'origine de transitions simultanées chez ces deux acteurs (adhésions et membrane).

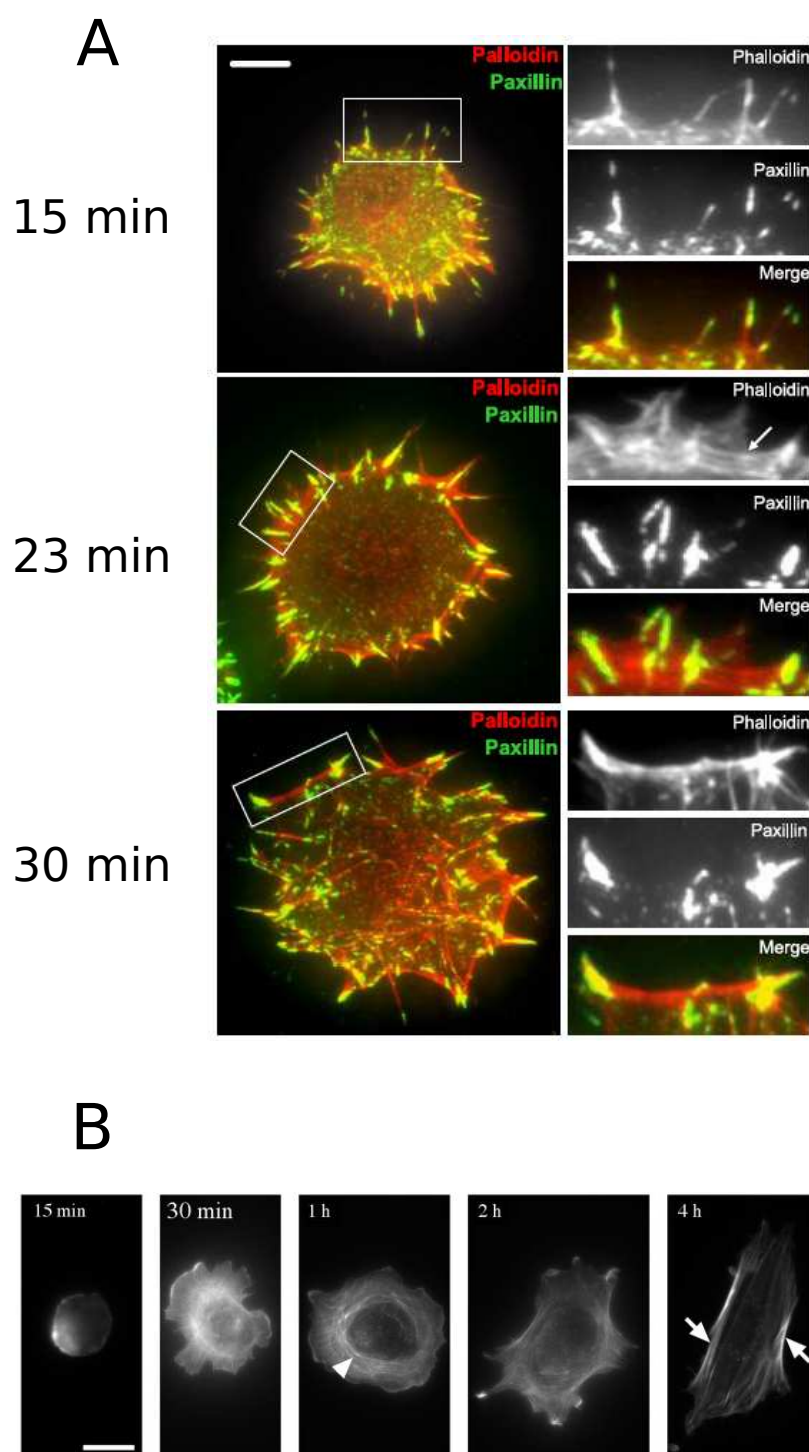


FIGURE 2.4 – A- Images en TIRF de la couronne d'adhésions reliant les fibres de stress à différentes étapes de l'étalement de fibroblastes [Partridge & Marcantonio, 2006]. B- Réorganisation des fibres de stress au cours de la polarisation de fibroblastes [Senju & Miyata, 2009].

2.2 Résultats expérimentaux

2.2.1 Procédure expérimentale et méthode d'analyse

Le coeur de cette partie consiste à observer l'étalement de fibroblastes embryonnaires de rats, aussi appelés Ref-52 (pour *Rat Embryonic Fibroblasts-52*) dont la paxilline a été fusionnée à la protéine fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*)². Nous rappelons que la paxilline est une protéine adaptatrice typique des complexes d'adhésion qui colocalise avec l'intégrine et joue un grand rôle dans la transduction de signaux partant de ces sites [Turner, 2000].

Nous cultivons ces cellules classiquement dans du milieu de culture auquel on a ajouté du sérum fœtal de veau (10%) de la glutamine (2mM) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine), puis nous les décollons à l'aide de trypsine. Les cellules sont ensuite maintenues en suspension pendant au moins deux heures, ce qui permet de renouveler les intégrines hydrolysées par la trypsine et d'éviter la phase de stagnation avec blebs décrite plus haut.

L'expérience se déroule ensuite dans une enceinte en plexiglas thermalisée à 37 °C à l'aide d'un dispositif de chauffage (AirTherm, WPI). Les cellules sont alors placées dans une chambre contenant du milieu de culture blanc (pour empêcher l'auto-fluorescence), avec 10% de sérum et 15 mM de tampon HEPES pour maintenir le pH constant dans la solution. Au fond de cette chambre est disposée une lamelle de verre qui a été auparavant rincée à l'éthanol et à l'eau distillée puis couverte d'une solution de fibronectine à 5 µg/mL pendant 30 minutes à 37°C.

L'étalement est imagé à l'aide d'un microscope Olympus IX-71 doté d'un objectif 100X (N.A = 1,45) et couplé à un dispositif TIRF (pour *Total Internal Reflection Fluorescence*) du même constructeur dont le laser émet à 488nm³. Cette technique reposant sur le principe des ondes évanescentes, l'onde incidente qui excite les fluorophores ne pénètre l'échantillon que sur une épaisseur de 150 à 200 nm. Par conséquent, le contraste obtenu est bien supérieur à celui d'une image de fluorescence en transmission où toutes les molécules du cytoplasme sont potentiellement excitées. Au contraire, nous exciterons ici seulement les protéines d'intérêt à savoir celles qui sont proches de la membrane, susceptibles de participer aux complexes d'adhésion.

La mise au point est réglée précisément grâce à un cristal piézoélectrique PIFOC (National Instruments) qui pilote et maintient la position de l'objectif. Quelques défocalisations peuvent néanmoins survenir ce qui oblige l'expérimentateur à corriger à la main la position de l'objectif en cours d'expérience. Les images ainsi produites sont recueillies à l'aide d'une caméra CCD (F-View, Olympus).

La figure 2.5-A montre les images TIRF d'une expérience typique d'étalement. Ces images laissent apparaître, surtout vers la fin de l'étalement, des agrégats intenses sur un fond plus diffus mais cependant plus intense que le fond noir de l'image. Les contours de ce fond diffus correspondent au bord de la cellule, comme le montrent les images

2. Cette souche a été créée et nous a été fournie par le laboratoire d'Alexander Bershadsky du Weitzmann Institute.

3. Cette longueur d'onde est généralement utilisée pour visualiser la GFP dont le spectre d'excitation est piquée autour de cette valeur ; cependant, YFP peut aussi être excitée à cette longueur d'onde.

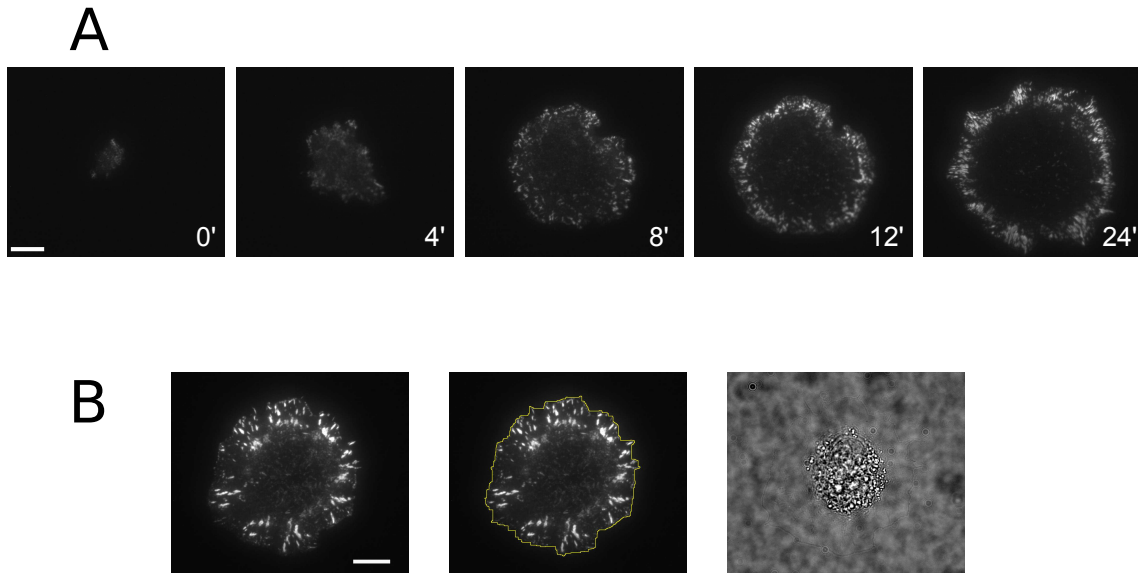


FIGURE 2.5 – A- Images en TIRF de l'étalement d'une cellule Ref-52 où la paxilline est marquée avec YFP. Echelle : $10\ \mu m$. B- A gauche, image en TIRF après 20 minutes d'étalement. Au centre, contour de la cellule déterminée par l'algorithme de détection automatique. A droite, image en lumière blanche à transmission (le contour de la membrane apparaît malheureusement très mal à l'impression).

prises en lumière blanche⁴ (Fig 2.5-B). Nous avons donc mis au point un programme de traitement d'images capable de détecter l'aire de ce fond, c'est-à-dire de tout le contact cellule-substrat, y compris l'extension lamellaire. Quant aux agrégats intenses, qui semblent à première vue correspondre aux complexes d'adhésion, la méthode qui nous a permis de les isoler fut déduite petit-à-petit comme nous le verrons dans les paragraphes suivants. Les détails concernant ces programmes sont présentés dans l'Annexe A.

La fréquence d'acquisition des images est une donnée très importante lorsqu'on utilise un microscope à fluorescence. En effet, cette fréquence doit être assez haute pour pouvoir enregistrer au maximum la dynamique des phénomènes en question, mais pas trop haute afin d'éviter les phénomènes de photoblanchiment et phototoxicité. Nous avons donc mesuré ces deux effets avant de choisir notre fréquence d'acquisition, qui est finalement de une image toutes les 30 secondes (voire une image toutes les 45 secondes pour quelques expériences). Les détails de ce travail sont présentés dans l'annexe B.

2.2.2 Cinétique du rayon cellulaire

Nous avons donc pu mesurer la cinétique de l'aire de contact cellule-substrat, notée A , au cours de l'étalement. L'étalement étant isotrope, nous avons, pour des raisons pratiques, réduit cette aire au rayon cellulaire, qui est donc défini comme $R = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$.

4. Notre microscope étant initialement dépourvu de shutter capable d'opérer une synchronisation entre prise d'images en TIRF et en lumière blanche, les premières données en TIRF n'ont pas leur équivalent en lumière blanche en transmission. Nous avons remédié à ce problème par la suite grâce à une lampe synchronisable (DiCon, FiberOptics Inc) dont la lumière est condensée à travers un objectif servant à la détection de la position de la plaque flexible (cf : chapitre 3).

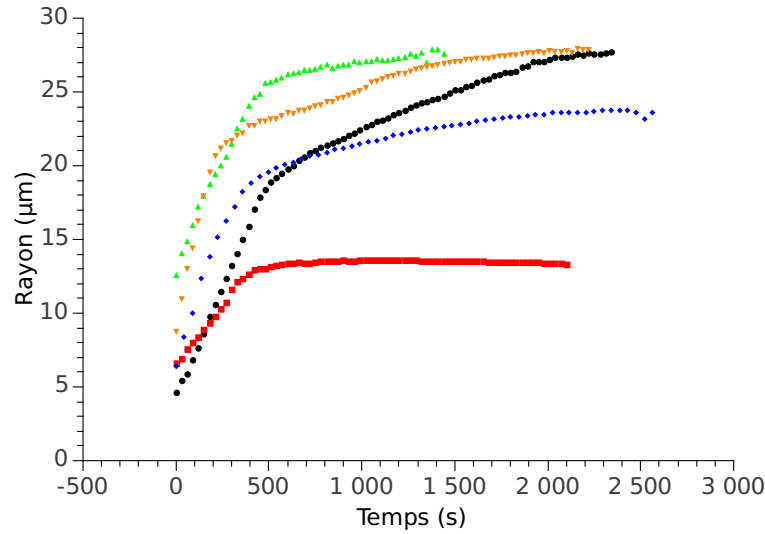


FIGURE 2.6 – Graphe montrant l'évolution du rayon de contact cellule-substrat en fonction du temps. Echantillon de 5 cellules.

Les courbes obtenues (Fig 2.6), montrent clairement deux phases. Une première phase, que l'on notera P_1 où le rayon croît proportionnellement au temps et une deuxième phase (P_2) durant laquelle le rayon continue de croître mais moins rapidement. La cinétique de cette seconde phase est variable selon les cellules et semble difficile à cerner ; nous ne chercherons donc pas à proposer une loi de comportement pour cette partie de la courbe.

Avec l'aide d'Olivier Cardoso, nous avons mis au point un algorithme afin de détecter objectivement la transition entre les deux phases. L'Annexe A contient une description détaillée de cet algorithme qui nous a permis de connaître le rayon et le temps moyens auxquels la transition a lieu ainsi que la vitesse de progression du rayon pendant la première phase.

Les résultats obtenus sur 23 cellules sont les suivants :

- Rayon de transition : $R_s^* = 18,3 \pm 0,8 \mu m$
- Temps de transition : $t_s^* = 451 \pm 56 s^5$
- Vitesse du rayon durant P_1 : $v = 0,028 \pm 0,002 \mu m.s^{-1}$ soit $1,7 \pm 0,12 \mu m.min^{-1}$

De plus, le rayon d'étalement après 20 minutes (soit 1200 secondes ce qui correspond approximativement à trois fois le temps de transition t_s^*) vaut en moyenne : $R_{sat} = 23,8 \pm 0,7 \mu m$. Cette valeur nous servira de base de comparaison pour caractériser la saturation du processus d'étalement par la suite.⁶

5. Ce temps est à prendre avec précaution car le temps zéro est mal défini dans nos expériences. En effet, au début des enregistrements, les cellules ont en général commencé à s'étaler légèrement.

6. Note importante : les notations utilisées ici seront reprises dans tout le reste du manuscrit. Ici, les grandeurs sont accompagnées d'un s pour signifier *spreading*. Par ailleurs, les erreurs correspondent à l'erreur standard des grandeurs mesurées, c'est-à-dire à la déviation standard divisée par la racine du nombre de cellules. Sauf mention contraire, nous utiliserons cette grandeur comme mesure de l'erreur dans tout le manuscrit.

Nous pouvons commenter dès à présent cette cinétique. L'existence de ces deux phases avec une transition autour de 450 secondes rappelle celles observées par [Cuvelier *et al.* , 2007; Döbereiner *et al.* , 2004; Étienne *et al.* , 2011], ce qui est rassurant. Néanmoins, toutes ces études mettent en évidence un premier régime où le rayon évolue en racine du temps. Cette différence est peut-être due à la différence de milieu utilisé, qui ne contient pas de sérum chez [Cuvelier *et al.* , 2007] et [Döbereiner *et al.* , 2004]; en effet, la présence de sérum augmente possiblement la polymérisation de l'actine. [Étienne *et al.* , 2011] ont quant à eux réalisé leurs expériences en présence de milieu mais n'ont pris en compte que la cinétique du corps cellulaire et pas la protrusion lamellaire à l'avant.

On peut toutefois se demander comment peut persister l'existence de ces deux phases avec un même temps caractéristique, malgré des méthodes de mesures aussi différentes.

2.2.3 Dynamique des complexes d'adhésion

Mesurer la dynamique des complexes d'adhésion suppose d'abord que nous définissions ce qu'est un complexe d'adhésion. Ceci n'est pas du tout évident *a priori* puisque, dans les images réalisées, l'histogramme des intensités (nombre de pixels de chaque intensité en fonction de cette intensité) ne laisse en général apparaître que deux pics, l'un correspondant au fond de l'image et l'autre à la cellule dans son ensemble, y compris les structures que l'on aurait tendance à interpréter comme des complexes d'adhésion (voir illustration Fig 2.7).

Dans un premier temps, nous avons donc seulement cherché à connaître la répartition de l'intensité lumineuse à l'intérieur de la cellule tout au long de l'étalement.

La figure 2.8-A montre ainsi l'intensité moyenne sur un périmètre d'épaisseur un pixel en fonction de la distance au centre de la cellule et ce pour chaque image de la pile, c'est-à-dire au cours du temps.

Grâce à ces diagrammes spatio-temporels, nous avons pu remarquer que pour beaucoup de cellules, une zone de grande intensité apparaît dans la deuxième partie de l'étalement, formant ainsi une couronne à l'avant de la cellule de largeur typique $10\ \mu\text{m}$ à l'état stationnaire. Cette couronne est formée de patchs intenses de paxilline allongés dans la direction radiale et dont le plus grand axe a une taille typique de $3\ \mu\text{m}$. Au contraire, les patchs formés au début de l'étalement sont souvent moins intenses, dirigés dans des directions plus variables et semblent s'évanouir beaucoup plus rapidement.

Les patchs intenses observés dans la couronne ont donc des propriétés qui rappellent celles des contacts focaux caractérisés chez les cellules adhérentes très étalées. Nous avons donc choisi de définir ces patchs comme objets d'intérêts dans notre problème. Nous les nommerons dans la suite *patchs d'adhésion*.

Afin d'isoler ces patchs, nous avons utilisé un seuil d'intensité ; les pixels dont l'intensité est supérieure au seuil sont considérés comme faisant partie des patchs d'adhésion, les autres non. Pour déterminer ce seuil, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires : l'une où le seuil est défini à la main au moment de l'apparition d'une couronne intense entourant la cellule, ce seuil est ensuite maintenu constant pour toutes les images ; dans l'autre méthode, le seuil est défini de manière automatique pour chaque image à partir d'une analyse entropique de l'histogramme des intensités. Le lecteur trouvera une description précise de ces méthodes et leur comparaison dans l'annexe A.

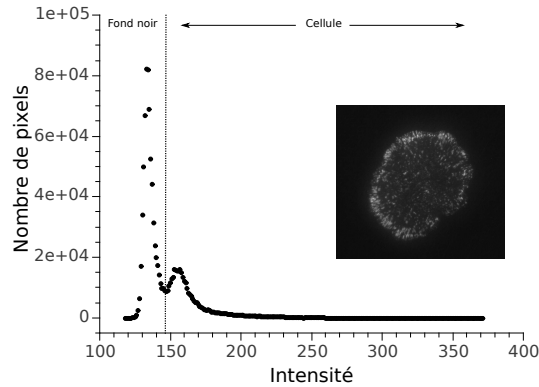


FIGURE 2.7 – Histogramme des intensités correspondant à l'image insérée.

Quoi qu'il en soit, ces deux méthodes donnent la plupart du temps des résultats très similaires, la méthode automatique étant en général plus bruitée mais moins sensible à un éventuel photo-blanchiment et de fait plus objective.

En délimitant les patchs d'adhésion, cette analyse nous permet donc d'avoir accès à l'intensité totale intégrée dans toute la zone d'adhésion (qui est définie comme la somme des intensités de tous les patchs d'adhésion), à l'aire de cette zone d'adhésion et à l'intensité moyenne dans les patchs. Dans tout ce manuscrit, nous ne considérerons jamais les patchs d'adhésion individuellement, mais seulement leur ensemble à l'échelle de toute la cellule, ce qui est une grande différence par rapport au travail de [Partridge & Marcantonio, 2006]. Nous parlerons alors de *zone d'adhésion*, d'*aire d'adhésion* ou de *patchs d'adhésion* invariablement pour parler de cette région.

La figure 2.8-B montre le comportement typique de l'intensité totale des patchs d'adhésion au cours du temps déterminée à partir de la méthode manuelle et de la méthode automatique. Nous observons qu'elle présente dans les deux cas trois phases distinctes : dans la première phase, l'intensité est constante et quasi-nulle, puis elle augmente rapidement avant d'atteindre un plateau dans un troisième temps (qui est éventuellement suivi d'une chute de l'intensité peut-être à cause du photoblanchiment).

L'intensité totale étant définie comme le produit de l'aire des patchs d'adhésion par l'intensité moyenne dans cette zone, on peut se demander si cette croissance de l'intensité totale dans la deuxième phase est due à une augmentation de l'aire de la zone d'adhésion ou à un renforcement de patchs d'adhésion déjà formés qui recruteraient de nouvelles protéines. La figure 2.8-B montre l'évolution de ces deux grandeurs en fonction du temps. On observe que l'aire de la zone d'adhésion suit le même comportement que l'intensité totale, variant de plusieurs ordres de grandeur durant ce processus, tandis que l'intensité moyenne est quasiment constante pendant ce temps⁷. Ceci signifie que ce sont bien des nouveaux patchs d'adhésion qui se sont formés au cours du temps ; c'est pourquoi par la suite nous nous concentrerons sur l'aire de la zone d'adhésion.

La figure 2.8-C présente le comportement de l'aire d'adhésion en fonction du temps pour plusieurs cellules différentes déterminé à partir de l'algorithme de détection automatique. Nous observons que l'algorithme ne détecte aucune adhésion pendant toute

7. Nous avons cependant relevé une légère croissance (de l'ordre de 15% en moyenne) qui corrèle avec l'apparition de la couronne de paxilline

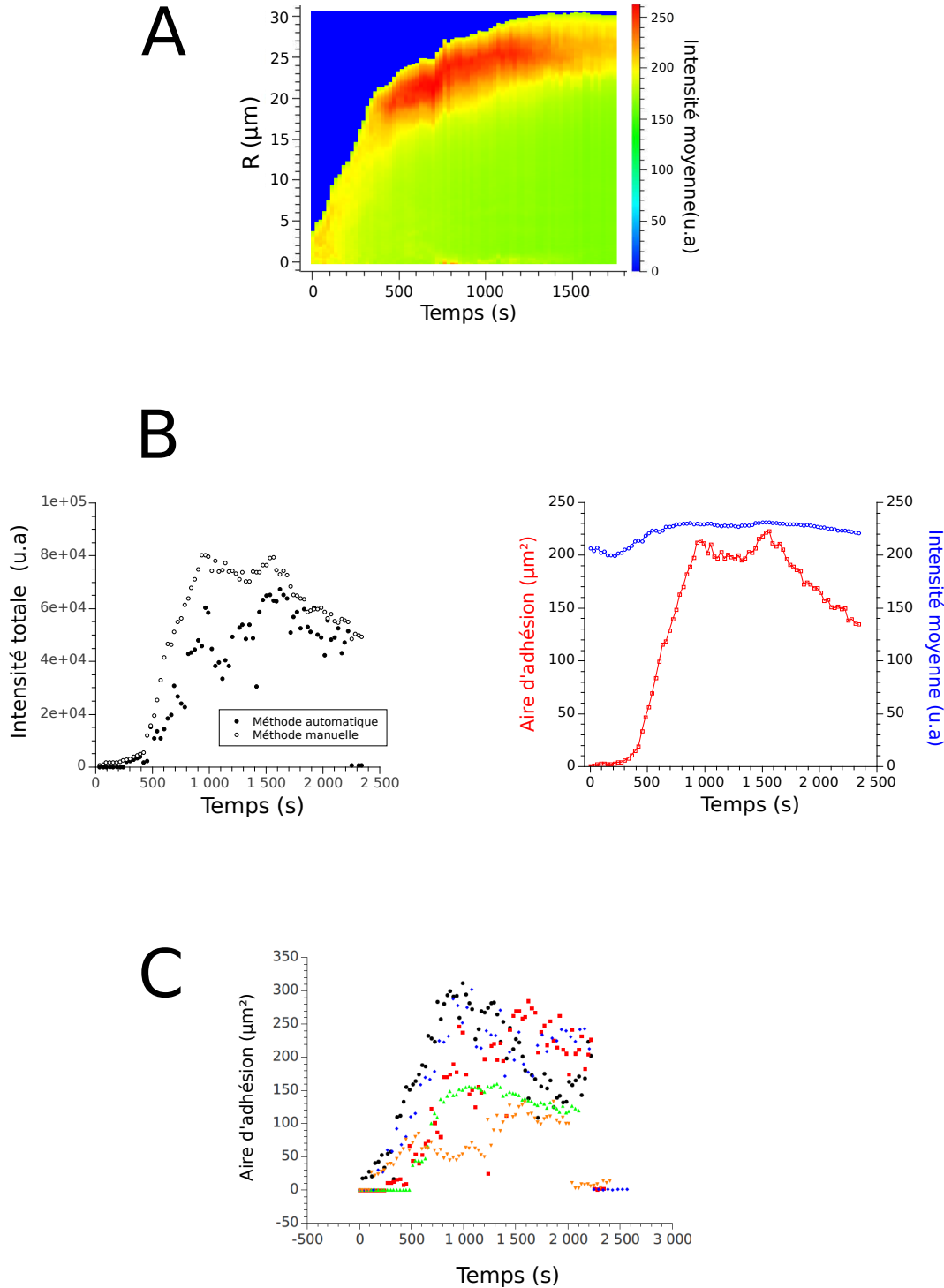


FIGURE 2.8 – A-Diagramme spatio-temporel typique représentant l'intensité moyenne sur un périmètre d'un pixel (couleur) en fonction de la distance au centre de la cellule (ordonnée) au cours du temps (abscisse). La frontière entre zone colorée et fond bleu représente le rayon cellulaire $R(t)$. B- A gauche, intensité totale typique dans la zone d'adhésion en fonction du temps, déterminée à l'aide de la méthode manuelle et de la méthode automatique. A droite, aire de la zone d'adhésion et intensité moyenne dans cette zone en fonction du temps. C- Aire de la zone d'adhésion déterminée à partir de la méthode automatique. Echantillon de 5 cellules.

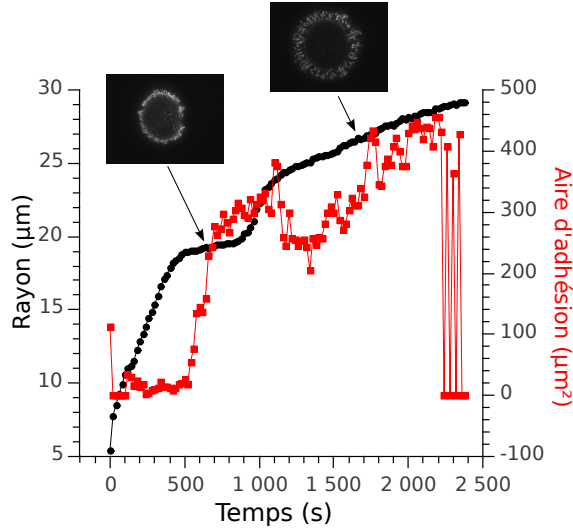


FIGURE 2.9 – Rayon et aire d’adhésion en fonction du temps pour un étalement en deux temps. Les images illustrent la formation de deux couronnes distinctes.

la première phase. Nous nous sommes donc servis de cette donnée pour caractériser la transition entre les deux premières phases.

Ainsi, la dernière image sans adhésion correspond en moyenne aux coordonnées suivantes :

- Rayon de transition : $R_a^* = 15,5 \pm 0,7 \mu m$
- Temps de transition : $t_a^* = 350 \pm 54 s$

De plus, l’aire d’adhésion après saturation du processus de croissance (c’est-à-dire après 20 minutes d’étalement) vaut en moyenne : $A_{sat} = 168 \pm 19 \mu m^2$. Les adhésions occupent donc en moyenne $\frac{A_{sat}}{\pi R_{sat}^2} = 10 \pm 1\%$ de l’aire cellulaire lorsque la couronne est formée.

2.2.4 Corrélation entre cinétique de l’étalement et formation des complexes d’adhésion

Nous avons vu dans les deux paragraphes précédents que l’étalement et les complexes d’adhésion possèdent tous deux deux régimes bien distincts, dont les transitions ont lieu en moyenne à des instants relativement proches (Pour rappel : $R_s^* = 18,3 \pm 0,8 \mu m$, $t_s^* = 451 \pm 56 s$ et $R_a^* = 15,5 \pm 0,7 \mu m$, $t_a^* = 350 \pm 54 s$). De plus, les diagrammes spatio-temporels comme celui de la Figure 2.8-A montrent que la couronne de paxilline semble apparaître à l’entrée dans la deuxième phase de l’étalement. Enfin, nous avons pu observer à plusieurs reprises des événements où une couronne de paxilline se forme très tôt durant l’étalement et dont la formation corrèle avec un ralentissement du rayon, puis cette couronne se défait et le rayon accélère de nouveau avant de ralentir une nouvelle fois avec la création d’une nouvelle couronne. (Un exemple est donné Fig 2.9.)

Toutes ces données nous poussent donc à nous interroger sur une possible synchronisation entre ces deux phénomènes, ralentissement de la croissance du rayon cellulaire et apparition des patches d’adhésion.

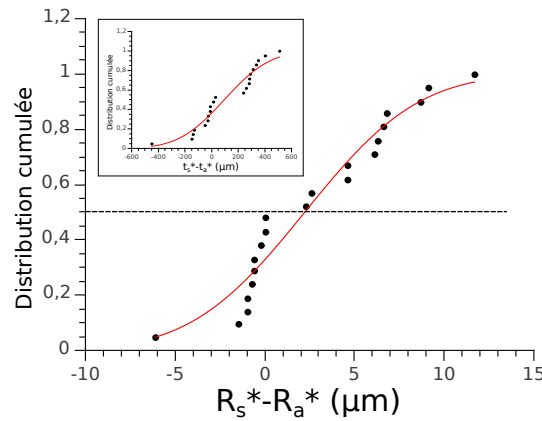


FIGURE 2.10 – Distribution cumulée des différences entre rayons de transition de l'étalement (R_s^*) et des adhésions (R_a^*) pour chaque cellule. La ligne rouge correspond à l'ajustement des données par une fonction erreur, caractéristique d'une distribution gaussienne. A titre d'exemple, le point d'ordonnée 0,5 signifie que 50% des cellules admettent une différence entre R_s^* et R_a^* supérieure à $2,5\mu m$ et 50% une différence inférieure à $2,5\mu m$.

La figure 2.10 montre la distribution cumulée des différences entre rayons et temps de transition pour les deux grandeurs. Nous observons ainsi trois choses importantes. Premièrement, dans la grande majorité des cas, l'étalement ralentit après l'apparition des premiers patches d'adhésion. Ensuite, chez un grand nombre de cellules les deux événements ont lieu en même temps, ce qui, ajouté à la première remarque, pourrait laisser penser à une distribution bimodale avec un rayon d'étalement ralentissant en même temps ou peu après l'apparition des patches d'adhésion. Enfin, il faut tout de même noter que les valeurs sont très largement distribuées (avec une amplitude de $15\mu m$ par exemple sur le rayon), ce qui nous empêche d'être définitifs quant à la séquence des événements.

En tout cas, si corrélation il y a, il semble plus probable que ce soit dans le sens de l'apparition des adhésions qui provoquent le ralentissement de l'étalement plutôt que l'inverse. Pour rejeter définitivement l'hypothèse contraire (ralentissement du rayon qui permet la formation des adhésions au bord de la cellule), nous avons employé des motifs de fibronectine de taille contrôlée⁸. Ainsi, nous avons pu bloquer l'étalement avant qu'il n'atteigne le rayon critique R_a^* d'apparition des patches d'adhésion.

Après 20 minutes d'étalement sur des motifs de rayons $9\mu m$ et $12\mu m$ (rayons qui sont à comparer à celui des cellules en suspension qui vaut $8,1 \pm 0,9\mu m$ SD), aucune cellule parmi 12 n'a montré de couronne de paxilline (Fig 2.11, à gauche). Dans ce cas, la surface de contact est couverte de petits points et entourée dans certains cas d'une fine ligne de points plus intenses. Aussi, l'algorithme de détection automatique des adhésions détecte comme zone d'intérêt sur ces images soit la cellule entière, soit des petits points de taille inférieure à $1\mu m$ dispersés aléatoirement sur toute la cellule.

En revanche, sur des motifs de taille supérieure à R_a^* , de même que sur les lamelles

8. La méthode de fabrication de ces motifs, développée au laboratoire par Olivier De Freitas, est présentée dans l'Annexe C.

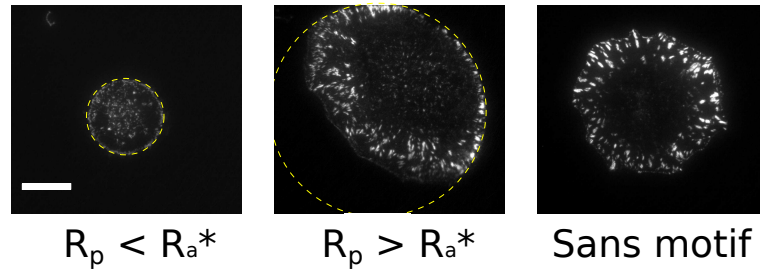


FIGURE 2.11 – Images de cellules sur des motifs adhésifs de fibronectine de taille variable après 20 minutes d'étalement. Échelle : $10\mu m$ (On peut noter sur l'image du milieu que c'est sur le bord libre, là où la lamelle et le corps cellulaire peuvent s'étaler, que se développe préférentiellement la couronne d'adhésion. Cette observation prendra tout son sens par la suite.)

uniformément couvertes de fibronectine, la couronne était bien détectable après le même temps (Fig 2.11).

Ces observations confirment donc ce qu'on avait pressenti en regardant la corrélation entre ralentissement du rayon et croissance des adhésions : ce n'est pas le ralentissement du rayon qui provoque l'apparition des adhésions.

2.2.5 Seuil d'apparition des adhésions - Angle de contact du corps cellulaire

On peut alors se demander quel paramètre est modifié à partir de ce rayon caractéristique R_a^* provoquant l'apparition de patchs qui ne sont pas présents pendant la première phase.

Une idée peut venir de la figure 2.12. Cette figure représente pour chaque cellule le rayon d'apparition des adhésions R_a^* en fonction du temps t_a^* où elles apparaissent. On observe ainsi que le rayon R_a^* est assez bien conservé d'une cellule à l'autre, avec une distribution resserrée autour de la valeur moyenne $R_a^*=15,5\mu m$, tandis que t_a^* possède une distribution beaucoup plus large. Même si le temps zéro est assez mal défini dans nos expériences - ce qui pourrait élargir la distribution des t_a^* - cette observation nous a tout de même conduit à chercher un critère purement géométrique pour expliquer le seuil d'apparition des adhésions.

Nous nous sommes donc intéressés à la forme du corps cellulaire au cours de l'étalement et en particulier à l'angle de contact formé par ce corps avec le substrat. Pour cela, nous avons fixé des cellules aux différentes étapes de l'étalement (avant, pendant et après la transition) reproduisant ainsi la cinétique moyenne du processus. Puis nous avons marqué l'actine filamenteuse et le noyau, la paxilline étant déjà marquée "naturellement". Ceci nous a permis de faire des images au microscope confocal montrant l'architecture interne des cellules au cours de l'étalement⁹ (Fig 2.13-A).

L'organisation de l'actine et la forme du corps cellulaire sur ces images sont très semblables à celles observées par [Bereiter-Hahn *et al.*, 1990] que nous avons décrites dans la section précédente. Nous allons donc les décrire très brièvement.

9. Les marquages et les images ont été réalisés par Alain Richert. L'Annexe D présente les détails du protocole de fixation et de marquage qu'il a utilisés ainsi que le dispositif de microscopie confocal.

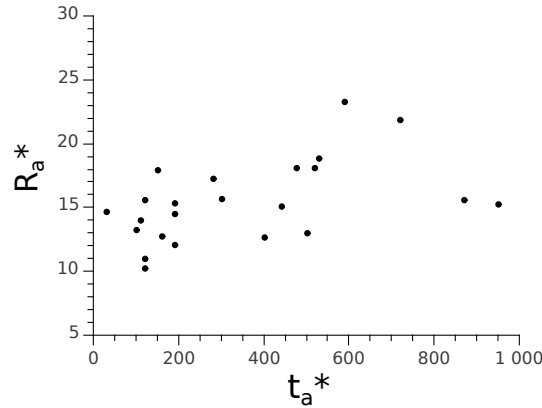


FIGURE 2.12 – Coordonnées spatio-temporelles correspondant au seuil d'apparition des adhésions pour chaque cellule.

Au milieu de P_1 , à savoir après trois minutes d'étalement, l'actine forme des protrusions dans des directions aléatoires, tandis que le corps cellulaire possède encore une forme très ronde.

Après sept minutes d'étalement (ce qui correspond au temps moyen où apparaissent les adhésions), une lamelle d'actine montrant de nombreux replis membranaires (*ruffles*) entoure la cellule et le corps cellulaire semble s'ouvrir sur le substrat, faisant ainsi une connexion entre le cortex et la lamelle. Nous avons pu vérifier par ailleurs que l'aire de contact cellule-substrat, incluant le corps cellulaire et la lamelle d'actine correspond bien à celle déterminée en TIRF après le même temps d'étalement. En d'autres termes, il est possible que les adhésions apparaissent au moment où la tangente à la surface du corps cellulaire au contact du substrat change d'inclinaison, c'est-à-dire lorsque l'angle de mouillage dépasse 90° (Fig 2.13-A et B).

Après 15 minutes d'étalement et durant tout P_2 , un faisceau de fibres d'actine orthoradiales entoure la cellule au niveau de la connexion entre le corps cellulaire et la lamelle plane à l'avant. Cette lamelle est terminée par une fine ligne d'actine d'un micron de largeur environ derrière laquelle s'organisent des patches de paxilline. Ces deux structures font donc penser au lamellipode (constitué uniquement d'actine) et à la lamelle (faite d'actine et de myosine et où l'on trouve les contacts focaux) observés chez les cellules en migration [Ponti *et al.*, 2004].

Si l'on s'intéresse maintenant à la forme de la cellule, la coupe de profil nous montre qu'elle prend une forme de chapeau de gendarme. Cette observation est importante par rapport à la discussion que nous avons au début du premier chapitre. En effet, nous avons alors considéré l'hypothèse selon laquelle la forme cellulaire pouvait être déterminée par l'équilibre des pressions donné par la loi de Laplace. Or, la forme d'une goutte contrôlée par cette loi est une calotte sphérique; elle ne doit donc admettre aucun changement de concavité. Par conséquent, la loi de Laplace n'est pas applicable directement pour les cellules, dont la forme admet de tels changements. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela : soit la pression n'est tout simplement pas uniforme à l'intérieur de la cellule, ce qui est envisageable car c'est un matériau inhomogène et très dense par endroits, soit les organelles (en particulier le noyau) opposent une force de rappel élastique sur le cortex et la membrane provoquant ainsi le changement de concavité. Mais cette forme pourrait également s'expliquer par la contraction des

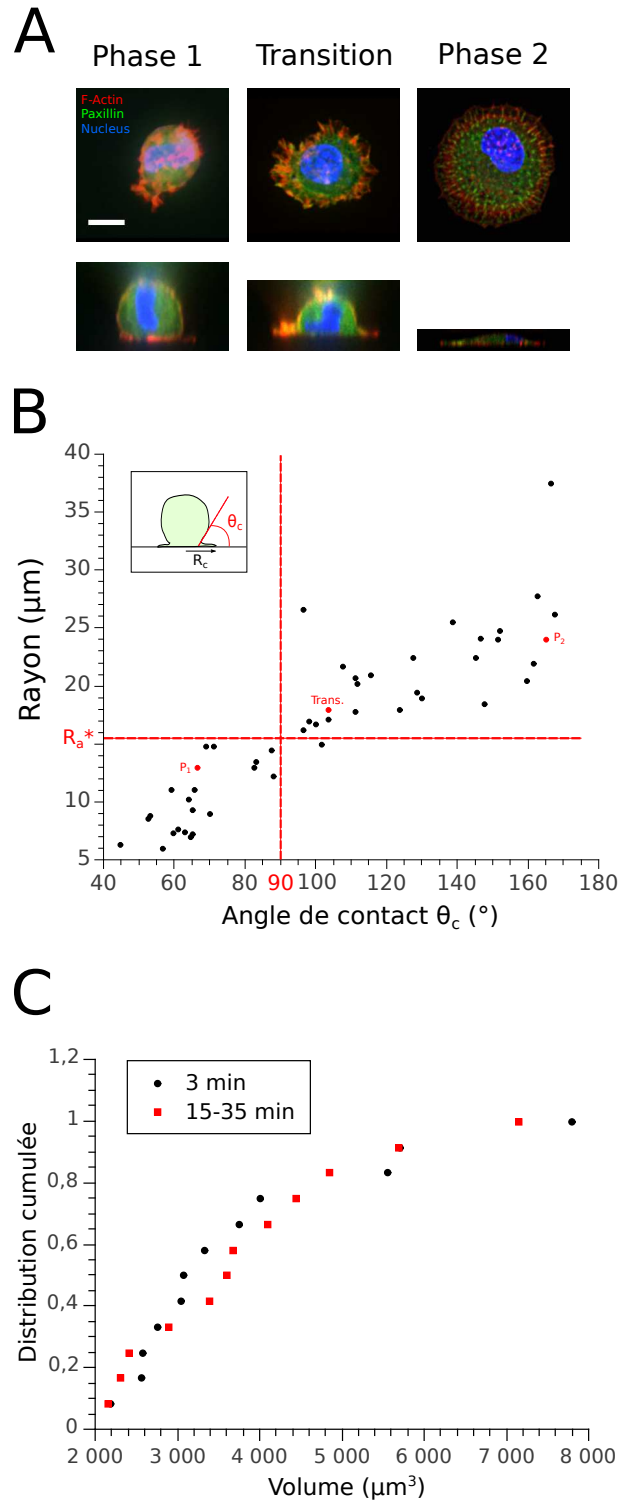


FIGURE 2.13 – A- Images typiques de cellules fixées aux différentes étapes de l'étalement et imagées au microscope confocal. En haut, vues du dessus, en bas vues en coupe. B- Rayon de contact cellule-substrat en fonction de l'angle de contact du corps cellulaire pour chaque cellule. Les points rouges correspondent aux cellules montrées en A. C- Distribution cumulée des volumes de cellules étalées depuis 3 minutes et entre 15 et 35 minutes.

fibres de stress orthoradiales dans le cas où celles-ci appliqueraient une tension plus importante que la tension du cortex.

Il est aussi remarquable que le corps cellulaire apparaisse très écrasé dans cette seconde phase, si bien que l'on peut se demander si le volume cellulaire est maintenu constant au long de l'étalement.

Nous avons donc mesuré les volumes de cellules au début (3 minutes) et à la fin de l'étalement (15-35 minutes) afin de vérifier la conservation du volume, qui est toujours invoquée dans les modèles théoriques de l'étalement sans avoir été réellement vérifiée.

La méthode de mesure utilise le logiciel de traitement d'images *FreeD* spécialement conçu pour les objets en 3 dimensions ; nous présentons cette méthode dans l'Annexe D. Les résultats sont présentés sur la figure 2.13-C qui ne montre aucune différence dans la distribution des volumes entre le début et la fin de l'étalement.

Par ailleurs, afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les adhésions apparaissent au moment où l'enveloppe du corps cellulaire change d'inclinaison, nous avons mesuré le rayon de contact cellule-substrat et l'avons représenté pour chaque cellule en fonction de l'angle de contact du corps cellulaire avec le substrat (Fig 2.13-B). Les points représentant chaque cellule s'organisent ainsi autour d'une courbe croissante qui semble croiser le point de coordonnées (90° , R_a^*) ; autrement dit l'apparition des adhésions telle que mesurée au microscope TIRF semble être synchronisée à un changement d'inclinaison du corps cellulaire par rapport au substrat, ce qui pourrait être synonyme d'une connexion entre le cortex d'acto-myosine et la protrusion d'actine à l'avant et d'un transfert de la tension corticale vers la lamelle et le lamellipode.

Cette observation va bien dans le sens d'un critère purement géométrique qui pourrait être à l'origine du seuil de formation des adhésions. De plus, cette idée est également cohérente avec le caractère mécano-sensible de la croissance des adhésions ; en effet, on peut imaginer que lorsque le cortex se connecte à la protrusion d'actine celui-ci impose soudainement une tension au bord de la cellule beaucoup plus grande que celle qui existait auparavant, induisant ainsi le renforcement et la croissance des adhésions naissantes en adhésions focales [Balaban *et al.* , 2001; Riveline *et al.* , 2001].

2.2.6 Effet de la tension interne sur l'étalement et la dynamique des complexes d'adhésion

Données statiques

Pour poursuivre dans cette voie, nous avons donc voulu savoir si la taille de la couronne de paxilline était sensible à la tension acto-myosine du cortex.

Pour ce faire, nous avons placé les cellules encore en suspension pendant 20 minutes en présence de différentes concentrations de blebbistatine, un inhibiteur classique de la myosine II. La figure 2.14-A montre les images typiques obtenues pour les différentes concentrations après 20 minutes d'étalement dans ce milieu. On observe que la couronne de paxilline est de moins en moins large au fur et à mesure que la concentration en blebbistatine augmente, de telle sorte que, pour une concentration de $50 \mu M$, seule une fine ligne de points intenses persiste en périphérie de la cellule. Ces points rappellent ceux entourant les cellules sur les plus petits motifs de fibronectine ; ils peuvent aussi être interprétés comme des adhésions naissantes dont l'existence est indépendante de

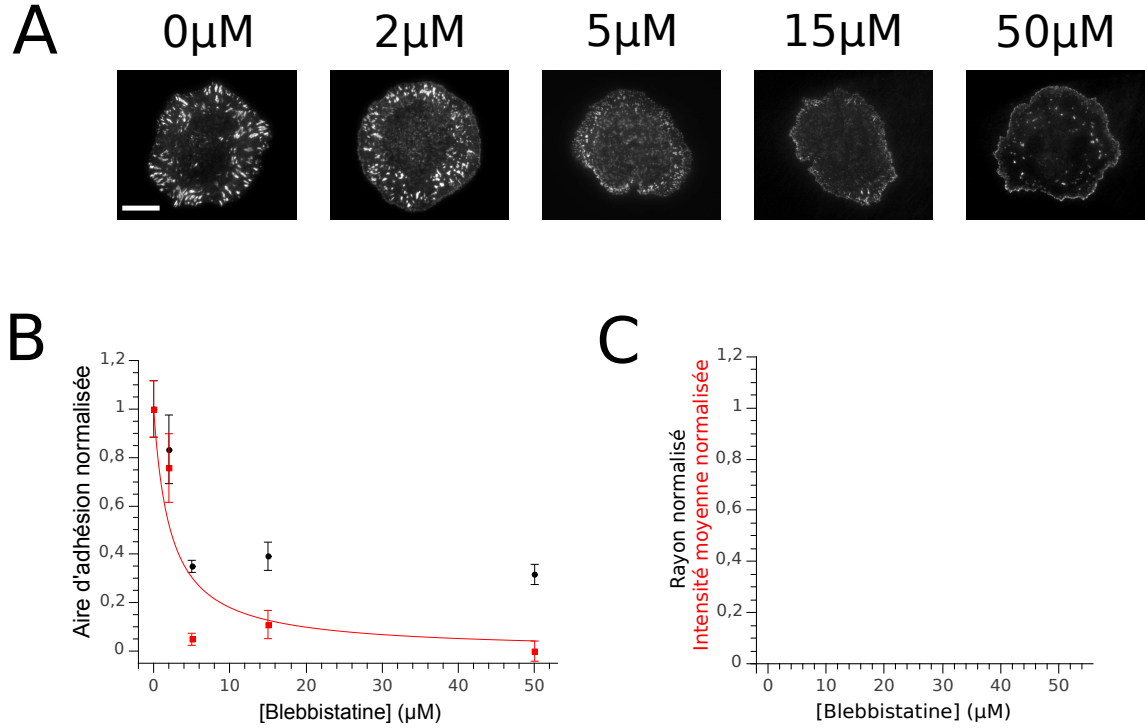


FIGURE 2.14 – A- Images typiques de cellules après 20 minutes d'étalement en fonction de la concentration de blebbistatine dans le milieu. B- Aire d'adhésion normalisée en fonction de la concentration en blebbistatine. La ligne rouge correspond à la loi d'inhibition de l'activité ATPasique de la myosine II par la blebbistatine ($k_i=2,2 \mu\text{M}$). C- Rayon des cellules et intensité moyenne dans les adhésions après 20 minutes d'étalement normalisés par leur valeur contrôle (pas de blebbistatine), en fonction de la dose de blebbistatine.

la myosine II [Choi *et al.* , 2008; Alexandrova *et al.* , 2008].

Nous avons ensuite cherché à quantifier l'aire de la couronne de paxilline en fonction de la concentration de blebbistatine. La figure 2.14-B montre ainsi en noir la valeur de $\frac{\langle (A_{adh}/A_c)(c) \rangle}{\langle (A_{adh}/A_c)(0) \rangle}$, où A_{adh} est l'aire de la zone d'adhésion, A_c l'aire de la cellule et c la concentration en blebbistatine. Cette courbe représente donc la proportion de l'aire de la couronne d'adhésion par rapport à l'aire de contact totale cellule-substrat normalisée par les valeurs contrôle sans blebbistatine. En rouge est représentée la même quantité à laquelle on a retiré la taille des points dont l'existence est indépendante de la myosine, c'est-à-dire : $\frac{\langle (A_{adh}/A_c)(c) \rangle - \langle (A_{adh}/A_c)(50) \rangle}{\langle (A_{adh}/A_c)(0) \rangle - \langle (A_{adh}/A_c)(50) \rangle}$ afin de prendre en compte uniquement la croissance des adhésions dépendante de la myosine.

Nous observons que cette grandeur décroît rapidement aux faibles concentrations puis stagne à des valeurs proches de zéro aux plus hautes concentrations avec une constante d'inhibition $k_i=2,2 \mu\text{M}$ (ligne rouge). Ce comportement est très similaire à la décroissance de l'activité ATPasique de la myosine II en fonction de la concentration en blebbistatine ($k_i=1,4 \mu\text{M}$), ce qui tend à montrer que la taille de la zone d'adhésion est directement proportionnelle au nombre de myosines II actives au sein des cellules. A noter qu'on retrouve aussi cette tendance dans les mesures de force de traction cellulaire entre deux plaques ($k_i=2,8 \mu\text{M}$) [Mitrossilis *et al.* , 2009], le rapprochement de ces deux

types de mesures (aire des adhésions et force maximale) serait donc cohérent avec le fait que la taille de la zone d'adhésion est proportionnelle à la force transmise au substrat.

Par ailleurs, comme le montre la figure 2.14-C, le rayon des cellules après 20 minutes d'étalement est indépendant de la concentration en blebbistatine, ce qui confirme que l'effet mentionné sur la croissance des adhésions est directement le fait de la myosine II et non d'une modification de l'étalement que provoquerait cette dernière jouant ainsi indirectement sur la taille des adhésions. On note aussi sur cette figure que l'intensité moyenne des patches d'adhésion n'est, elle non plus, pas affectée par l'ajout de blebbistatine, la myosine II régule donc la croissance des sites d'adhésion mais pas la densité de leurs constituants.

Données dynamiques

Cependant, les expériences proposées ci-dessus n'offrent qu'une vision statique du problème, à la fin du processus de formation de la couronne d'adhésion. Or, nous aimerions savoir si la tension corticale a aussi un impact sur le seuil d'apparition des adhésions et éventuellement sur la cinétique de l'étalement.

Pour faire ces mesures dynamiques, nous n'avons pas pu utiliser la blebbistatine car cette molécule est sensible à la lumière et se désactive en particulier à la longueur d'onde de notre laser. Nous avons donc utilisé un autre inhibiteur de la contractilité acto-myosine : Y-27632, qui inhibe ROCK (ou Rho-Kinase), kinase connue pour phosphoryler les chaînes légères de myosines. Pour cela, nous avons laissé les cellules à incuber pendant 30 minutes dans du milieu contenant $8 \mu M$ de Y-27632.

Ainsi, nous avons pu mesurer la cinétique de l'étalement et la formation des adhésions de cellules dont la contractilité est diminuée.

Comme pour les conditions de contrôle, l'étalement en présence de Y-27632 se déroule en deux phases et les adhésions n'apparaissent qu'après un certain temps (Fig 2.15-A). Les paramètres caractérisant ces deux régimes sont même très similaires à ceux du contrôle, la seule différence majeure étant l'aire finale de la zone d'adhésion, nettement plus faible que celle du contrôle.

Sur 16 cellules, nous obtenons les moyennes suivantes¹⁰ :

- Rayon de transition pour l'étalement : $R_s^* = 19,7 \pm 1,0 \mu m$
- Temps de transition pour l'étalement : $t_s^* = 530 \pm 60 \text{ s}$
- Vitesse du rayon durant P_1 : $v = 0,027 \pm 0,004 \mu m.s^{-1}$ soit $1,6 \pm 0,24 \mu m.min^{-1}$
- Rayon cellulaire après 20 minutes : $R_{sat} = 23,8 \pm 0,7 \mu m$
- Rayon de transition pour les adhésions : $R_a^* = 16,6 \pm 0,5 \mu m$
- Temps de transition pour les adhésions : $t_a^* = 380 \pm 40 \text{ s}$
- Aire de la zone d'adhésion après 20 minutes : $A_{sat} = 41 \pm 7 \mu m^2$

Ainsi, on voit à partir de ces chiffres que la cinétique de l'étalement est indépendante du nombre de myosines II actives dans la première comme dans la deuxième phase (même vitesse durant P_1 , même rayon de transition, même taille cellulaire après 20 minutes d'étalement). De même, les adhésions commencent à se former à partir du même rayon ($R_a^{*Y} = 16,6 \pm 0,5 \mu m$ contre $R_a^* = 15,5 \pm 0,7 \mu m$ dans le cas contrôle). D'autre part, l'idée selon laquelle elles apparaîtraient avec le changement d'inclinaison

10. Tous ces résultats ainsi que les autres conditions testées sont résumés dans le tableau récapitulatif à la fin de ce manuscrit (p. 159)

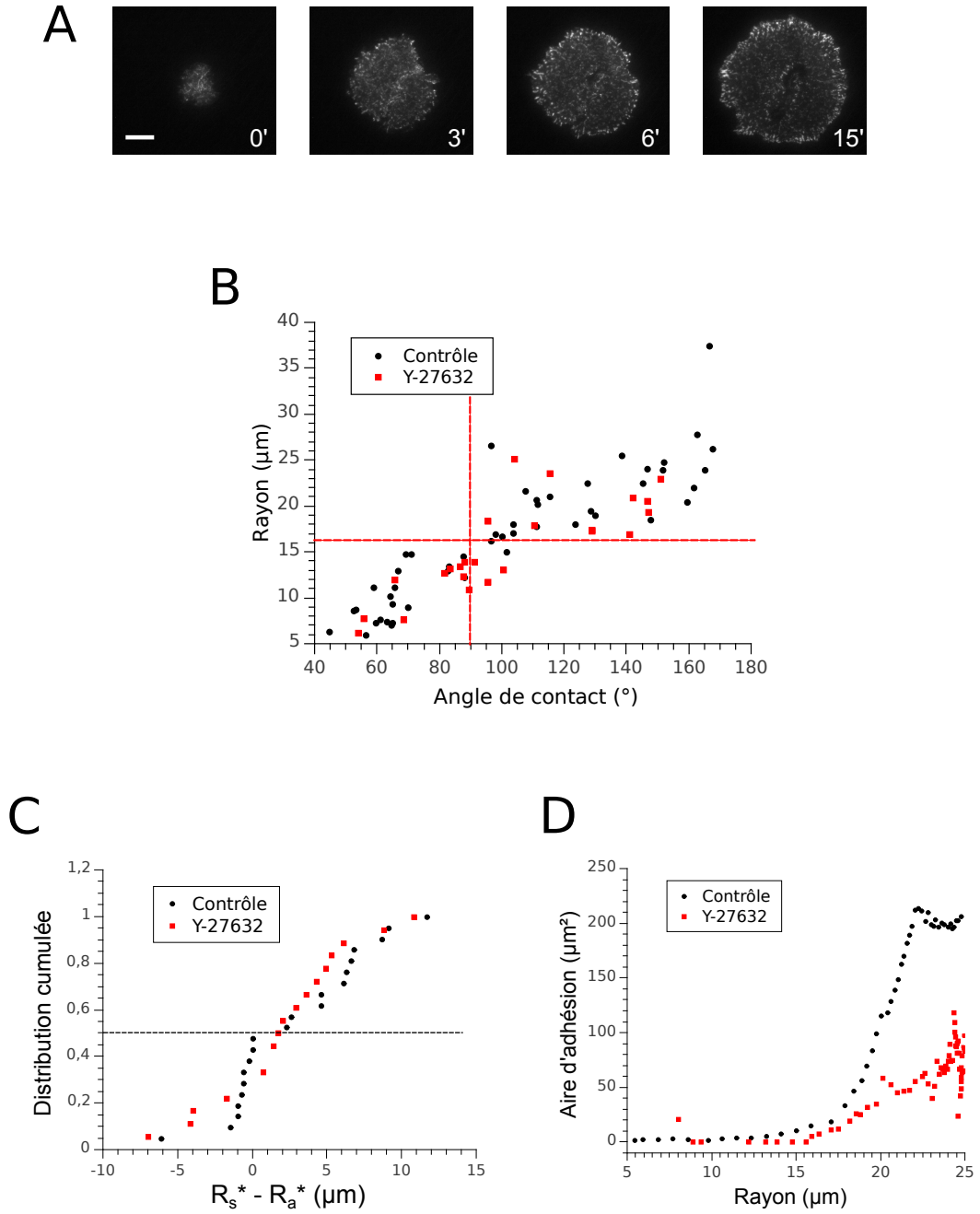


FIGURE 2.15 – A- Images typiques de l'étalement d'une cellule en présence de $8\mu M$ de Y-27632. Echelle : $10\mu m$. B- Comparaison des rayons de contact cellule-substrat en fonction de l'angle de contact du corps cellulaire avec ou sans le traitement avec Y-27632. C- Distribution cumulée des différences entre rayons de transition de l'étalement (R_s^*) et des adhésions (R_a^*) avec ou sans le traitement avec Y-27632. D- Aire d'adhésion en fonction du rayon de contact pour une cellule contrôle typique et une cellule traitée avec Y-27632.

du corps cellulaire est confirmée par les mesures en microscopie confocale du rayon et de l'angle de contact (Fig 2.15-B). De plus, la figure 2.15-C que la distribution de la différence entre rayons de transition ($R_s^* - R_a^*$) est également inchangée.

Toutefois, l'aire finale de la zone d'adhésion est dépendante et même proportionnelle à l'activité contractile de la cellule, comme dans le cas de la blebbistatine, puisque après 20 minutes d'étalement : $\frac{\langle A_{max}^Y \rangle}{\langle A_{max} \rangle} \simeq \frac{41}{168} \simeq 25\%$. (La figure 2.15-D illustre ce résultat à partir de deux cellules typiques des deux conditions.) Or, à la concentration de 8 μM utilisée, Y-27632 laisse actives environ 20% des myosines présentes initialement dans la cellule [Niggli, 1999].

Un scénario de l'étalement semble donc émerger où la première phase de l'étalement serait indépendante de l'activité de la myosine II. Puis les adhésions commenceraient à apparaître sous l'effet de la connexion entre le corps cellulaire et la lamelle d'actine en contact avec le substrat, la tension corticale étant alors transférée à la lamelle et par conséquent aux adhésions naissantes. La croissance des adhésions serait ainsi d'autant plus forte que le cortex est contractile. Cependant, les caractéristiques de la deuxième phase de l'étalement semblent indépendantes de la tension corticale. On peut alors imaginer que les adhésions servent de tampon de force et encaissent la tension du cortex pour permettre à l'étalement de se poursuivre dans cette deuxième phase. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons maintenant étudier l'impact de la densité de ligands et de leur spécificité vis-à-vis de l'intégrine sur la formation des adhésions et la cinétique de l'étalement.

2.2.7 Effet de la spécificité du substrat et de la densité de ligands

Etalement sur polylysine

Nous avons testé l'effet de la spécificité de l'adhésion sur les phénomènes décrits jusqu'à présent en couvrant les lamelles de verre d'une solution de poly-L-lysine (0,01%, poids moléculaire : 70 000-150 000 Da) pendant 30 minutes à 37°C avant l'expérience. Cette protéine est un polymère formé de plusieurs lysines et chargé positivement, ce qui permet une attache électrostatique mais non-spécifique de la membrane avec le substrat.

La figure 2.16-A montre plusieurs images de l'étalement d'un fibroblaste Ref-52 dans ces conditions. Nous avons réalisé des expériences de ce type sur $n=16$ cellules. On observe au début de l'étalement un phénotype assez différent de celui observé sur fibronectine avec de nombreux petits points répandus sur toute la surface de contact. Dans une deuxième phase de l'étalement, les phénotypes observés sont un peu plus divers : certaines cellules montrent juste quelques points un peu plus larges et plus intenses en périphérie le reste étant couvert de petits points, d'autres montrent des patchs assez larges bien que moins étendus que ceux observés sur fibronectine ; enfin, d'autres cellules laissent apparaître en périphérie de longs filets centripète de paxilline qui, d'après les images vidéos, semblent glisser au-dessus du substrat suivant un mouvement rétrograde. Par conséquent, même si les données récupérées à partir de l'algorithme de détection automatique et répertoriées dans le tableau récapitulatif page 159 à la fin de cette section montrent qu'ils sont en moyenne très peu étendus et qu'ils apparaissent nettement après la transition du rayon, il est très difficile de parler d'un

comportement général des patches d'adhésion dans ces conditions.

L'analyse de la cinétique de l'étalement montre en revanche plusieurs choses intéressantes. Tout d'abord, le rayon croît linéairement avec le temps pendant la première phase et sa vitesse est inchangée par rapport à l'étalement sur fibronectine ($v = 0,029 \pm 0,004 \mu m.s^{-1}$). Cependant, la transition vers la seconde phase a lieu en moyenne à un rayon plus faible ($18,3 \pm 0,8 \mu m$ contre $15,8 \pm 1,0 \mu m$ sur fibronectine) qui correspond au rayon où commencent à se former les adhésions sur fibronectine. De plus, comme le montre la figure 2.16-C, le rayon cellulaire mesuré après 20 minutes d'étalement est plus faible que sur fibronectine.

Ceci indique donc que l'étalement est indépendant de la spécificité de l'adhésion lors de la première phase, ce qui confirme la nature plutôt physique de cette phase comme l'avaient envisagé plusieurs auteurs avant nous. On observe ensuite que la transition entre P1 et P2 a lieu au même rayon que celui où apparaissent les adhésions habituellement sur fibronectine. La transition sur polylysine aurait donc lieu lorsque la tension corticale est transférée à la lamelle. Ceci tend à montrer la nécessité de faire croître des adhésions pour s'affranchir d'une tension corticale rétrograde de nature à stopper l'étalement. Malgré cela, l'étalement se poursuit dans la seconde phase et rares sont les cellules qui stagnent en ce point. Toutefois, le rayon cellulaire s'accroît légèrement moins dans la deuxième phase sur polylysine que sur fibronectine ($\Delta R_{PLL} = 4,1 \mu m$, $\Delta R_{fibro} = 5,5 \mu m$) ; ce phénomène est encore plus visible sur l'aire cellulaire ($\Delta A_{PLL} = 460 \mu m^2$, $\Delta A_{fibro} = 730 \mu m^2$).

Etalement à faible concentration de fibronectine

Pour vérifier certains des résultats obtenus au paragraphe précédent et pour approfondir la question de l'effet de la chimie du substrat sur l'étalement, nous avons choisi d'observer l'étalement en recouvrant les lamelles d'une solution de fibronectine de concentration dix fois inférieure à celle utilisée auparavant ($0,5 \mu g.mL^{-1}$). Notons toutefois que les résultats présentés ici ne sont que préliminaires puisqu'ils ne concernent que 10 cellules.

Les effets sur la cinétique de l'étalement sont très similaires à ceux observés sur polylysine : on observe deux phases avec la vitesse du rayon dans la première phase qui est la même que celle mesurée jusque là dans chacune des conditions investiguées ($v = 0,028 \pm 0,003 \mu m.s^{-1}$). Par ailleurs, la transition a lieu à peu près en même temps que l'apparition des adhésions ($R_s^* = 14,5 \pm 1,1 \mu m$ et $R_a^* = 15,2 \pm 1,2 \mu m$). De plus, le rayon atteint après 20 minutes d'étalement ($R_{sat} = 20,7 \pm 0,9 \mu m$) est très similaire à celui mesuré sur polylysine et donc inférieur à celui mesuré pour une plus grande concentration en fibronectine, ce qui nous conduit aux mêmes conclusions que précédemment.

En revanche, si l'étalement est similaire à celui mesuré sur polylysine, ici les patches d'adhésion sont plus clairement formés. Comme le montre la figure 2.16-B, leur phénotype est intermédiaire entre ceux observés sur polylysine et ceux observés pour une concentration en fibronectine normale, c'est-à-dire qu'on observe une couronne de patches d'adhésion clairement définis en périphérie de la cellule mais ces patches sont plus effilés comme si ils avaient été formés le long des lignes de courant du flux rétrograde d'actine sans un recrutement très actif. Par ailleurs, la densité d'adhésion

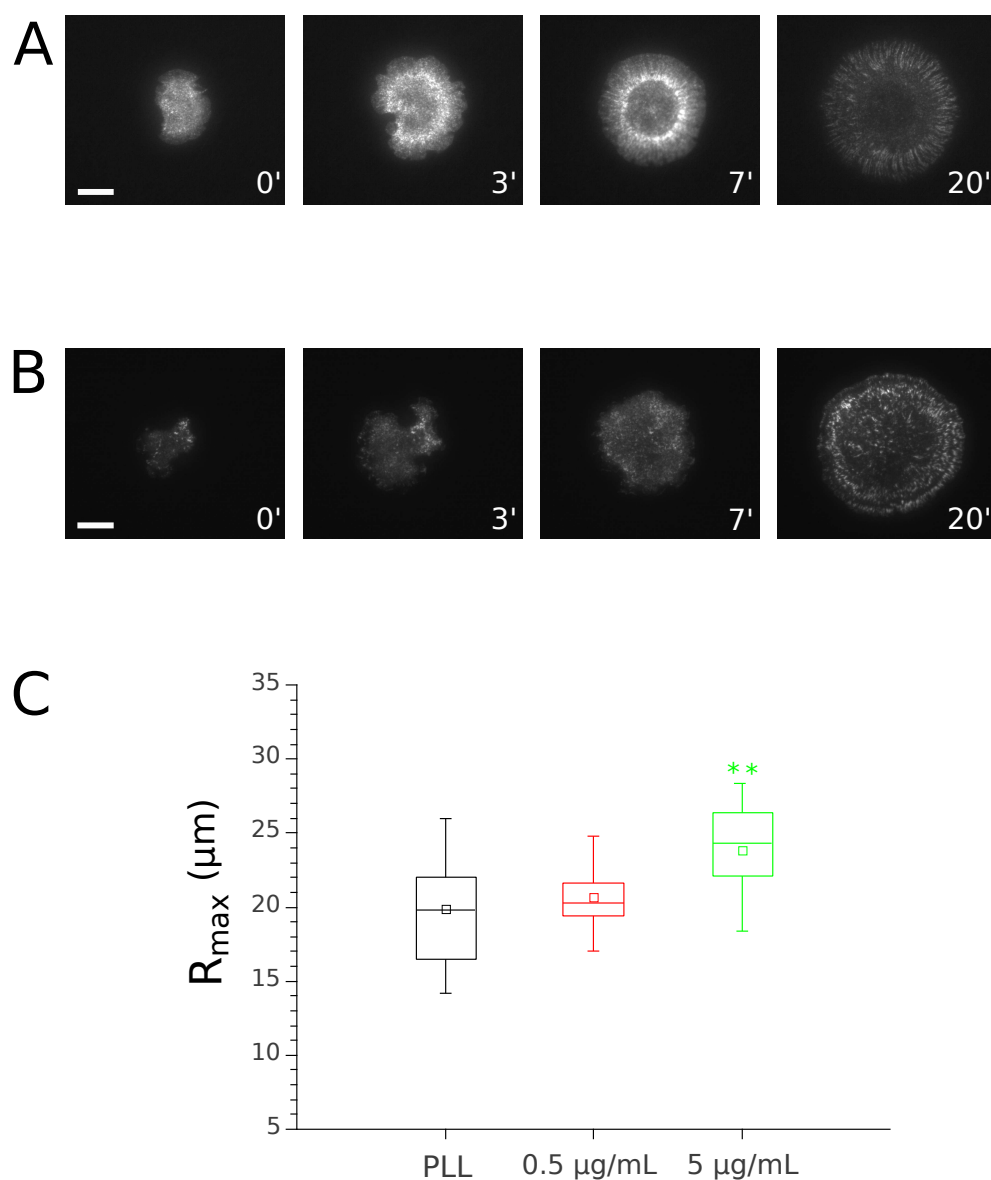


FIGURE 2.16 – Images montrant un étalement typique sur un substrat couvert de A - polylysine B- fibronectine à 0,5µg/mL. Echelle : 10 µm. C- Rayons après 20 minutes d'étalement en fonction du traitement de surface du substrat. PLL = poly-L-lysine ; 0,5µg/mL = 0,5µg/mL de fibronectine ; 5µg/mL = 5µg/mL de fibronectine. La distribution à 5µg/mL est significativement différente des deux autres (p-value : 0,004 et 0,010).

à l'équilibre n'est pas modifiée par la réduction du nombre de ligands accessibles ($\frac{A_{adh}}{A_c} = 0, 10 \pm 0, 02$).

Par contre, dans l'hypothèse où le recrutement de la paxilline est proportionnel au nombre de liens entre intégrine et fibronectine, on peut s'attendre à ce que la vitesse à laquelle apparaissent les patchs d'adhésion soit dépendante de la concentration en ligands. Nous avons donc quantifié l'accroissement d'aire d'adhésion ($\frac{dA_{adh}}{dt}$) pour chaque cellule dans les deux conditions expérimentales.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- $\langle \frac{dA_{adh}}{dt} \rangle^5 = 0,34 \pm 0,03 \mu m^2.s^{-1}$
- $\langle \frac{dA_{adh}}{dt} \rangle^{0,5} = 0,27 \pm 0,02 \mu m^2.s^{-1}$

Bien que ces deux valeurs soient très proches, il semble donc que le recrutement de la paxilline a lieu légèrement plus rapidement à une plus haute concentration en fibronectine.

Ces résultats confirment donc l'idée selon laquelle la croissance de l'aire de contact cellule-substrat durant la seconde phase de l'étalement dépend de la capacité de la cellule à créer des patchs d'adhésion.

2.2.8 Morphologie de la membrane au cours de l'étalement

Nous n'avons pas pu imager toutes nos expériences en lumière blanche. Cependant, sur les quelques films que nous possédons, la membrane plasmique montre des changements d'aspect flagrants qu'il nous faut mentionner.

Au début de l'étalement, on voit apparaître sur le front à l'avant de la cellule des contrastes lumineux très prononcés et dont la position change d'une image à l'autre. Ceci laisse penser que la membrane est très dynamique et agitée. Cependant, il ne semble pas qu'elle soit décollée du substrat puisque de telles variations ne sont pas observables en TIRF. On peut donc penser qu'il s'agit de protrusions d'actine qui s'extraient de la lamelle et poussent contre la membrane libre.

Quoi qu'il en soit, cette activité diminue petit-à-petit au fur et à mesure que la couronne d'adhésion se forme (Fig 2.17). Finalement, la membrane se plaque contre le substrat et devient quasiment invisible en lumière blanche en transmission. Il semble par ailleurs que cet événement intervienne toujours après l'apparition des adhésions et l'entrée dans la phase 2 de l'étalement (ceci reste cependant à vérifier avec un plus grand nombre de mesures).

Le comportement décrit ici existe à la fois dans les conditions de contrôle et chez les cellules traitées avec Y-27632, mais pas chez les cellules étalées sur polylysine. Celles-ci conservent en effet une activité résiduelle même quand l'étalement est arrivé à saturation. L'origine de ce changement de phase de la membrane est encore inconnu. On peut toutefois imaginer deux possibilités : soit il est dû à l'épuisement d'un réservoir de membrane, auquel cas on peut comprendre que ce changement de phase soit coordonné avec la cinétique de l'étalement, soit ce sont tout simplement les adhésions qui plaquent la membrane contre le substrat et l'empêchent ainsi de se soulever. Le fait que les cellules étalées sur polylysine laissent apparaître une activité résiduelle va plutôt dans le sens de cette dernière hypothèse. On peut par ailleurs écarter l'hypothèse selon laquelle ce changement de phase serait dû à l'arrêt de l'étalement. En effet, les cellules déposées

sur des petits motifs de fibronectine montrent encore une grande activité membranaire même lorsque la cellule a atteint une forme globale à l'équilibre (voir encadré Fig 2.17).

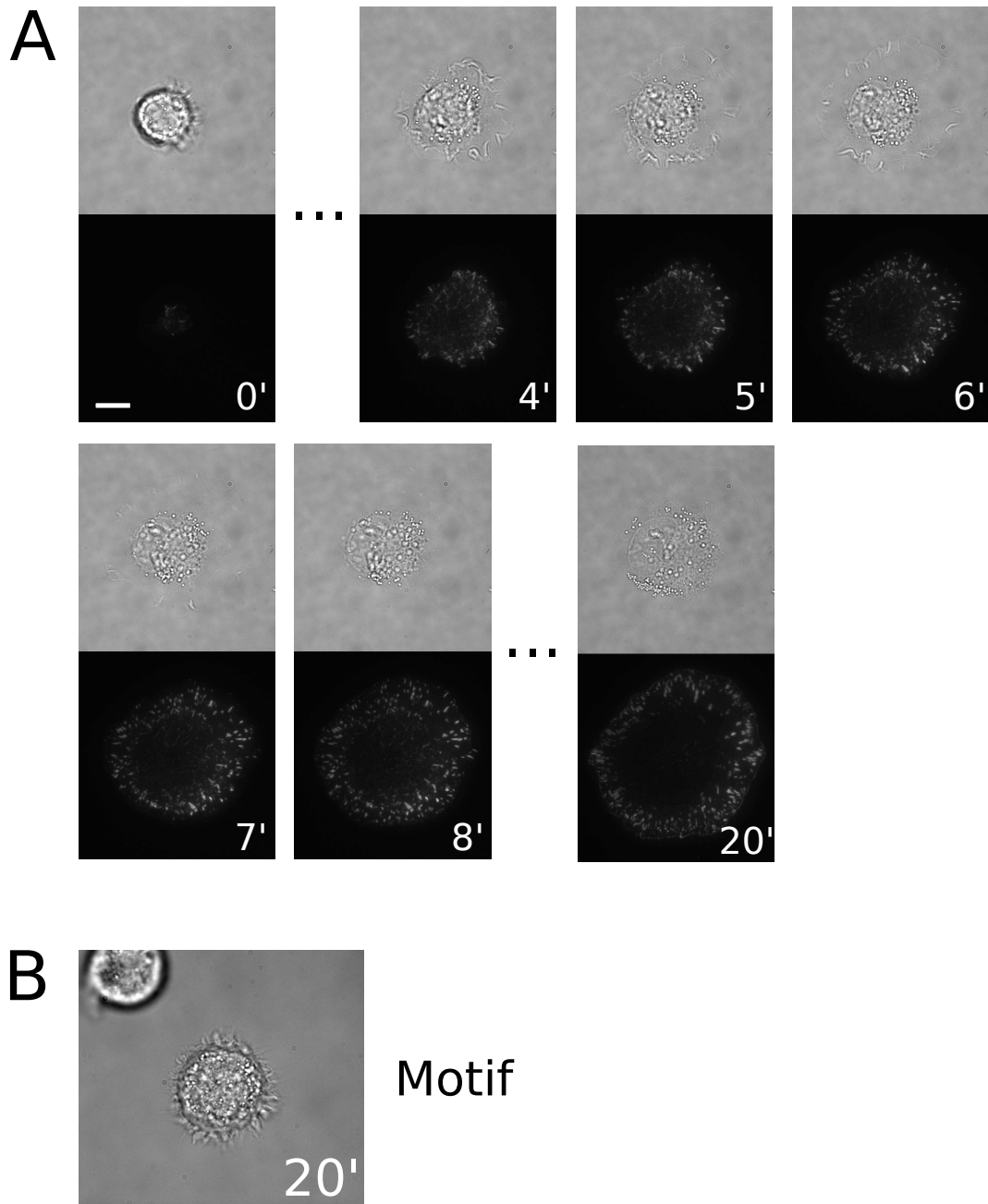


FIGURE 2.17 – A- Images montrant l'évolution typique des ruffles de membrane parallèlement à la formation de la couronne de paxilline. Echelle : $10\mu m$. B- Morphologie de la membrane d'une cellule étalée sur un petit motif adhésif pendant 20 minutes.

2.3 Discussion et perspectives

2.3.1 Vers un modèle intégré de l'étalement cellulaire

Au vu des expériences présentées dans la section précédente, nous sommes maintenant capables de fournir un scénario cohérent de l'étalement précoce des cellules animales. Ce scénario s'articule en deux phases bien distinctes durant lesquelles la forme du corps cellulaire, l'organisation des patchs d'adhésion et la cinétique de l'étalement possèdent des allures très différentes.

Durant la première phase de l'étalement, le rayon cellulaire croît proportionnellement au temps. Nous avons montré que cette cinétique est indépendante de la contractilité acto-myosine et du traitement de surface du substrat ; en effet les expériences faites en présence d'Y-27632, une drogue inhibant l'action de la myosine II, ou en couvrant le substrat de poly-L-lysine, une protéine non-spécifique de l'adhésion cellule-matrice, montrent un premier régime où le rayon croît proportionnellement au temps avec une vitesse d'étalement conservée. L'augmentation de l'aire de contact a alors lieu grâce à l'avancée d'une protrusion pleine d'actine et parcourue de nombreux ruffles, comme l'indiquent les images de cellules fixées en microscopie confocale et les films en lumière blanche. De plus, les images en TIRF ne montrent aucun patch d'adhésion mature durant cette phase. Enfin, on note que la forme du corps cellulaire ressemble alors à celle d'une goutte non-mouillante, celui-ci faisant un angle de contact avec le substrat inférieur à 90° .

En poursuivant son étalement, le corps cellulaire parvient à un angle de 90° avec le substrat. La corrélation des images prises en microscopie confocale avec celles réalisées en TIRF nous a révélé que les premières adhésions apparaissent précisément à cet angle, au bout de la protrusion d'actine. De nombreux patchs croissent alors en périphérie de la cellule créant une couronne d'adhésions.

Connaissant le caractère mécano-sensible de la croissance des adhésions, on peut penser que la synchronisation de ces deux événements (angle de contact et apparition des adhésions) est le fait de la connexion entre le cortex contractile de la cellule et la protrusion d'actine. Cette idée est appuyée par deux autres résultats. D'une part, la couronne d'adhésions ne peut se développer lorsque l'étalement cellulaire est contraint par des motifs adhésifs de petite taille. D'autre part, les adhésions apparaissent au même rayon en présence de l'inhibiteur de contractilité alors que la surface à l'équilibre de la zone d'adhésion dépend de la concentration en myosines II actives dans la cellule. Cette surface est même proportionnelle à cette dernière, confirmant ainsi le lien entre contractilité et taille de la couronne d'adhésion.

Cette coordination entre forme du corps cellulaire et formation des adhésions semble aussi corrélée avec la transition vers la deuxième phase de l'étalement, c'est-à-dire le ralentissement de l'avancée du rayon cellulaire. On peut donc penser que le ralentissement du rayon est la conséquence de la connexion entre le front d'actine à l'avant et le cortex contractile d'acto-myosine. En effet, alors que dans la première phase, la somme des forces contractiles du cortex va dans le même sens que les forces protrusives de la lamelle d'actine, au moment du changement d'inclinaison du corps, le sens de cette force contractile s'inverse et s'oppose donc à l'avancée du front d'actine (Fig 2.18). Alors, il est possible que la présence des adhésions isole le lamellipode du cortex

en transmettant la force contractile au substrat, ce qui permet *in fine* la poursuite de l'étalement.

Cette idée va de pair avec le fait que la deuxième phase de l'étalement possède des comportements variables selon les cellules et surtout selon la densité de ligands disponibles sur le substrat. En effet, l'étalement durant P2 est beaucoup plus faible sur des substrats où les adhésions se forment difficilement (polylysine, fibronectine à faible concentration). Dans ce cas, on peut imaginer que la cellule continue son activité protrusive mais qu'elle dérape sur le substrat, ne pouvant faire de liens entre le cytosquelette et le substrat. On observe ainsi, sur polylysine, que les agrégats de paxilline prennent la forme de longs fils radiaux qui semblent glisser à l'intérieur de la lamelle avec un mouvement rétrograde.

Il est donc vraisemblable que l'étalement ne puisse se poursuivre sans la mise en place de patches d'adhésion, les forces corticales s'opposant à la polymérisation de l'actine n'étant pas transmise au substrat. Cependant, même en présence d'adhésions, l'étalement finit par ralentir. Ce ralentissement est probablement dû à un accroissement de la tension de membrane, comme l'ont montré [Gauthier *et al.*, 2011]. Le fait que les ruffles au niveau de la lamelle se lissent au moment de la transition de la vitesse d'étalement abonde dans ce sens. Une tension de membrane accrue pourrait donc ralentir la vitesse de polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule, et ainsi l'étalement global de la cellule. En accord avec cette idée, [Gauthier *et al.*, 2011] ont montré que l'avancée du front cellulaire dans la deuxième phase de l'étalement se fait par saccades correspondantes à des événements d'exocytose qui relâchent la tension membranaire.

De plus, la transition de l'étalement arrive en moyenne légèrement après l'apparition des adhésions. Ceci laisse penser que ces deux événements ont des causes indépendantes, l'apparition des adhésions étant gouvernée par la projection du cortex sur la lamelle et le ralentissement de l'étalement par l'épuisement d'un réservoir de membrane. Dans ce cas, la relative simultanéité des deux événements pourrait être le fait d'une sélection qui aurait optimisé la quantité de membrane disponible. Mais on peut également imaginer que le ralentissement de l'étalement et l'apparition des adhésions sont reliés causalement au travers de l'ancrage qui existe entre la membrane plasmique et le cortex. Dans l'expression de la tension de membrane apparaît en effet un terme provenant du lien physique avec le cortex [Norman *et al.*, 2010].

Malgré cette incertitude, notre représentation de l'étalement fait la synthèse entre les différentes idées présentes dans la littérature. En effet, plusieurs auteurs avaient été amenés à considérer la première phase de l'étalement comme un phénomène purement physique contrôlé par un gain d'énergie d'adhésion ou par la polymérisation de l'actine. Nos mesures montrant l'indépendance de la cinétique envers la contractilité et l'adhésion (pas d'adhésions matures sur fibronectine, cinétique inchangée sur polylysine) laissent ainsi penser à un phénomène géré par la polymérisation de l'actine tel que l'avaient décrit [Fardin *et al.*, 2010].

Par ailleurs, comme dans les mesures et le modèle de [Étienne *et al.*, 2011], la transition entre P1 et P2 est ici contrôlée par un paramètre géométrique à l'échelle de la cellule entière, correspondant au moment où l'aire de contact entre le corps et le substrat atteint l'aire de la section initiale de la cellule. De plus, l'observation de l'apparition d'une couronne d'adhésion permettant l'étalement dans la seconde phase,

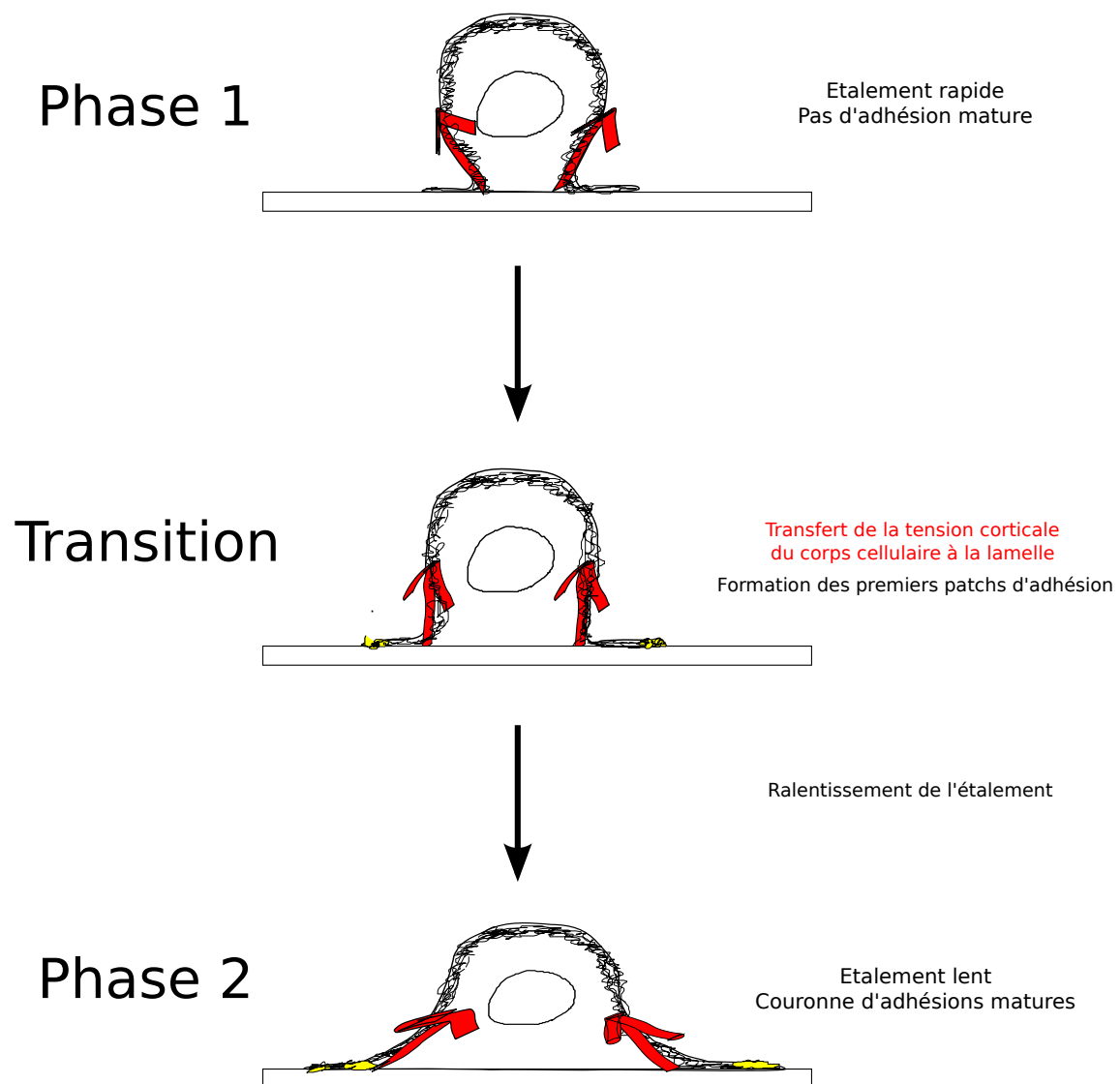


FIGURE 2.18 – Modèle décrivant les propriétés des deux phases principales de l'étalement précoc. La transition entre les phases est gouvernée par un changement d'angle du corps cellulaire et sa connexion avec le front d'actine polymérisant à l'avant.

coïncide avec les résultats de [Zhang *et al.* , 2008] qui montrèrent que des cellules sans taline s'étaient durant la première phase puis se rétractent à l'entrée dans la seconde phase, soulignant ainsi la nécessité de connecter le cytosquelette au substrat pour poursuivre l'étalement. Pour finir, le fait que l'aire finale soit dépendante de la densité de ligands sur le substrat recoupe les données de [Reinhart-King *et al.* , 2005] et [Mooney *et al.* , 1995].

En conclusion, le scénario de l'étalement que nous proposons fait le lien entre la géométrie de la cellule, l'apparition des adhésions et la cinétique de l'étalement et suggère un critère géométrique, l'angle de contact du corps cellulaire, comme origine de la transition entre les deux phases de l'étalement. Ce scénario possède l'avantage d'intégrer plusieurs données de la littérature en un modèle cohérent de l'étalement. Néanmoins, comme nous allons le voir tout de suite, de nombreuses choses restent à réaliser pour parfaire ce modèle.

2.3.2 Perspectives

Expériences en vue d'une confirmation du modèle

Afin de compléter le schéma de l'étalement que nous avons décrit plus haut, il est nécessaire de connaître la nature du moteur de l'étalement pendant la première phase (énergie d'adhésion ou polymérisation de l'actine). Célian Bimbard a réalisé son stage au laboratoire afin d'élucider cette question. Pour cela, il a observé l'étalement de cellules traitées à la latrunculine A, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine. La dose utilisée est faible ($0,05 \mu M$) ce qui permet de séquestrer une partie des monomères d'actine susceptibles de polymériser tout en épargnant le cortex. Ainsi, il a pu vérifier que la vitesse durant P1 est notablement diminuée par l'ajout de latrunculine A (Fig 2.19-A). Les cellules s'étaient moins vite aussi durant P2 mais, en renormalisant par le temps caractéristique de P1 (noté τ), les courbes moyennes d'étalement avec et sans latrunculine A se superposent (Fig 2.19-B). Ces observations indiquent donc clairement que le moteur de l'étalement durant P1 et P2 est bien la polymérisation de l'actine. De plus, le rayon d'apparition de la couronne d'adhésions ainsi que la densité d'adhésion à l'équilibre ne sont pas modifiés (Fig 2.19-C et D), ce qui confirme que la maturation des adhésions ne dépend pas de la vitesse d'étalement mais uniquement de la géométrie de la cellule et du nombre de myosines II actives.

D'autre part, certaines mesures et rapprochements que nous avons faits dans ce chapitre gagneraient à être précisés. Par exemple, pour regarder le rôle des adhésions dans l'étalement durant la deuxième phase nous avons changé le nombre de ligands accessibles sur le substrat ; toutefois, la cellule peut toujours s'attacher au substrat et continuer de s'étaler, même sur polylysine. Une autre méthode pour réduire le nombre de contacts cellule-substrat consisterait à empêcher la traduction de l'intégrine dans la cellule en utilisant de l'ARN interférant. Nous nous attendons alors, d'après notre modèle, à voir la première phase de l'étalement inchangée, puis la cellule devrait stopper brusquement son étalement à l'entrée dans la seconde phase.

Une méthode moins coûteuse mais plus aléatoire pour réaliser ce genre d'expériences serait de verser de la trypsine directement dans la chambre expérimentale. Ainsi les intégrines seraient hydrolysées avant même d'avoir pu faire le contact avec le substrat.

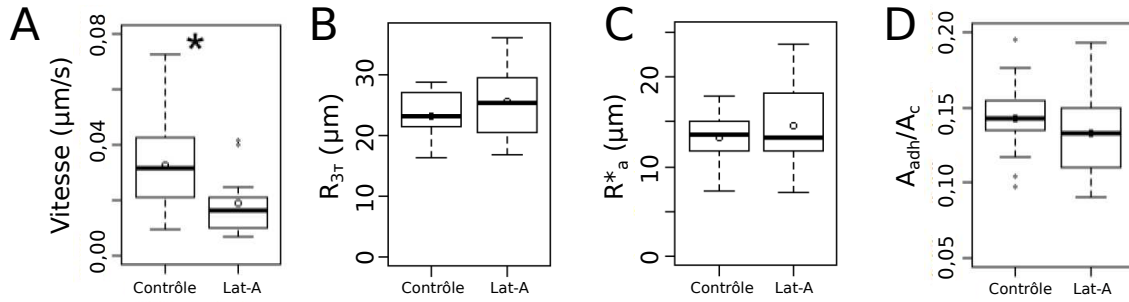


FIGURE 2.19 – Histogrammes montrant A- la vitesse d'étalement du rayon de contact cellule-substrat pendant P1, B- le rayon de contact cellule-substrat après 3τ , *i.e* trois fois le temps caractéristique moyen de P1, C- le rayon d'apparition des adhésions D- la fraction de la zone de contact cellule-substrat occupée par des adhésions en fonction du traitement (Contrôle ou Latrunculine A).

Enfin, nous avons mis en évidence une corrélation entre inclinaison du corps cellulaire et apparition des adhésions sur des mesures moyennes faites à partir d'un grand nombre de cellules différentes. Il s'agirait maintenant pour aller plus loin de faire la même chose mais en mesurant les deux paramètres simultanément sur les mêmes cellules. Pour cela, il faudra faire des mesures en direct au microscope confocal sur des cellules vivantes en essayant de limiter au maximum l'effet toxique de la lumière sur les fluorophores.

Toutefois, si ces mesures confirment une synchronisation entre les deux phénomènes, elles ne diront rien sur le rapport causal entre les deux. Alors, pour vérifier que c'est bien l'inclinaison du corps cellulaire qui crée les adhésions, on pourrait empêcher l'étalement de ce corps sur une partie de la cellule tout en laissant la lamelle d'actine s'étaler. Pour cela, nous pourrions disposer une plaque de verre contre la cellule légèrement au-dessus du substrat et observer si des adhésions se forment au bout de la lamelle étalée.

Mesures de la tension de membrane

Nous avons vu dans le premier chapitre que la membrane plasmique est un acteur de toute première importance pour la morphogénèse cellulaire. Il n'est donc pas étonnant qu'elle joue un rôle dans la cinétique de l'étalement, comme l'ont montré [Gauthier *et al.*, 2011]. Dans cette étude, les auteurs remarquèrent que l'entrée dans P2 coïncide avec un accroissement simultané du nombre d'événements d'exocytose et de la tension de membrane mesurée à l'aide d'un tether. Nos observations sur la morphologie de la membrane suggèrent un comportement similaire puisqu'on observe que cette dernière est plaquée sur le substrat à l'entrée dans P2.

Nous aimerions aller plus loin et éventuellement pouvoir mesurer directement la tension de membrane au cours de l'étalement. Pour ce faire, nous pourrions utiliser du Laurdan, un agent fluorescent qui s'intercale dans la membrane et dont la longueur d'onde d'émission dépend de la tension entre les lipides [Zhang *et al.*, 2006]. Cette technique, déjà utilisée par [Gaus *et al.*, 2006] dans une étude sur le rapport entre adhésion et tension de membrane, nous renseignerait sur cette tension plus directement

que le tether, qui est plutôt sensible aux attaches entre la membrane et le cortex ; de plus, cette approche nécessiterait très peu de modifications du dispositif expérimental.

Corrélation avec la force de traction

Une autre perspective à ce travail serait de mettre en parallèle les différents paramètres et événements décrits dans ce chapitre (forme du corps cellulaire, transition de l'étalement, apparition des patches d'adhésion) avec l'évolution de la force transmise au substrat.

A l'aide du rhéomètre à cellule unique, Nathalie Bui et Pauline Durand, en thèse au laboratoire, ont commencé à corréler l'évolution de la forme du corps cellulaire avec celle de la force transmise à la plaque flexible du rhéomètre chez des fibroblastes Ref-52. Les premières mesures montrent une synchronisation entre le moment où la force commence à croître et le moment où la cellule prend une forme cylindrique (un exemple est donné Fig 2.20-A et B et la statistique est présentée Fig 2.20-C). Si on fait l'hypothèse que les adhésions croissent effectivement sous l'effet de la force, cette observation est cohérente avec nos mesures montrant que les adhésions apparaissent au moment du changement d'inclinaison du corps cellulaire.

Cependant, nous aimerions aussi pouvoir corréler directement la force avec la formation des complexes d'adhésion. C'était le but premier de notre thèse, c'est une perspective évidente du travail présenté jusqu'ici et c'est ce dont nous allons traiter dans le prochain chapitre.

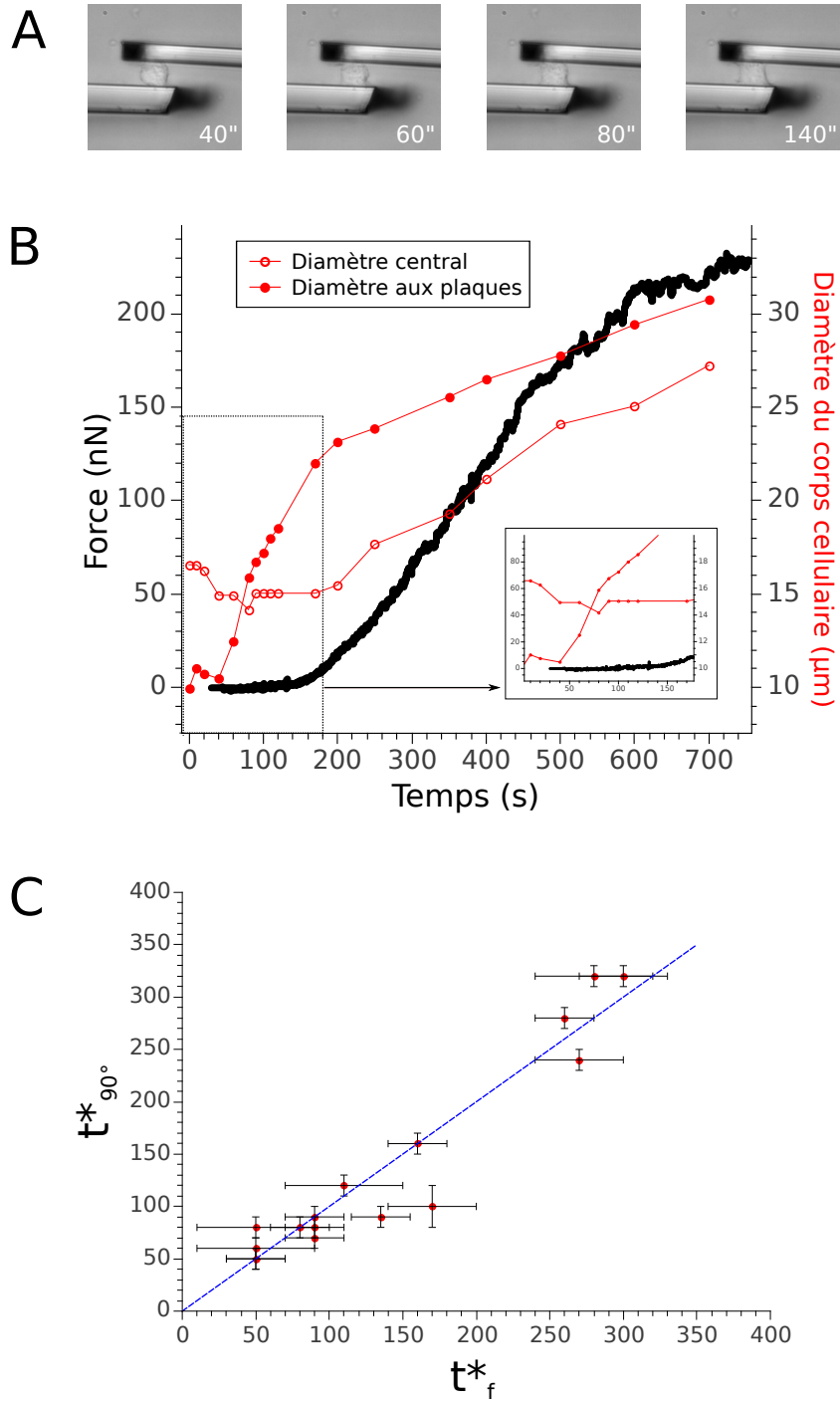


FIGURE 2.20 – A- Images montrant l'évolution de la forme d'une cellule Ref-52 dans les premiers moments d'une expérience de force de traction entre deux micro-plaques. B- Graphe montrant la force de traction et les diamètres caractéristiques de la forme cellulaire en fonction du temps. En encadré, zoom sur le début de l'expérience. Le croisement des diamètres correspond à un angle de contact de 90° . C- Graphe montrant le temps $t_{90^\circ}^*$ où la cellule prend une forme cylindrique en fonction du temps t_f^* où la force commence à augmenter pour chacune des cellules testées.

CHAPITRE 3

Forme, force, adhésions : étalement d'une cellule entre deux plaques

Sommaire

3.1	Dispositif expérimental	111
3.1.1	Principe et géométrie du dispositif	111
3.1.2	Dispositif de détection de la force	111
3.1.3	Interfacage et rétroaction	118
3.1.4	Limites du dispositif	119
3.1.5	Procédure expérimentale	121
3.2	Résultats expérimentaux	122
3.2.1	Observations générales	122
3.2.2	Étalement, force et adhésions	122
3.2.3	Corrélation entre cinétique de l'étalement et formation des complexes d'adhésion	126
3.2.4	Corrélation entre apparition de la force et des adhésions - Effet de la raideur	127
3.2.5	Variation des paramètres de transition selon la raideur	129
3.2.6	Croissance de la force et des adhésions - Expériences à raideur variable	129
3.2.7	Saturation de la force et des adhésions	130
3.3	Discussion et perspectives	132
3.3.1	Discussion	132
3.3.2	Perspectives	137

Dans ce chapitre, nous allons commencer par nous intéresser à ce qui a été le plus gros travail de cette thèse, à savoir la mise au point d'un dispositif qui permet de mesurer la force de traction d'une cellule entre deux plaques tout en caractérisant son étalement et la dynamique de ses complexes d'adhésion. Ce dispositif nous a ainsi permis d'obtenir des informations à deux échelles spatiales caractéristiques différentes. Grâce à lui, nous avons en effet pu mesurer simultanément la contractilité à l'échelle de la cellule entière et imager les agrégats protéiques qui transmettent au substrat la force générée.

Les expériences réalisées à partir de cet outil devraient nous permettre de répondre à des questions à plusieurs niveaux. Tout d'abord, nous allons pouvoir compléter les mesures du chapitre précédent auxquelles la force manquait cruellement, et peut-être savoir si cette dernière peut contrôler l'apparition et le développement des adhésions. Plus généralement, ces mesures devraient nous permettre de préciser le rapport, toujours en débat, entre la taille des adhésions et la force transmise au substrat.

Par ailleurs, ces mesures compléteront les expériences de traction cellulaire entre deux plaques réalisées au laboratoire et dans l'équipe de Daniel Fletcher. Nous espérons ainsi comprendre plus en profondeur le rôle des adhésions et de l'étalement dans la production de la force de traction et l'adaptation quasi-instantanée de cette force à la raideur de l'environnement. En effet, étant donné que le taux de production de force s'adapte à la raideur, on peut s'attendre à ce que les complexes d'adhésion, qui transmettent cette force au substrat, s'adaptent eux aussi à la raideur. D'autre part, Démsthène Mitrossilis avait remarqué dans sa thèse que la génération d'une force de traction est indissociable d'un étalement du corps cellulaire [Mitrossilis *et al.*, 2009]. Des simulations modélisant la cellule par un réseau d'éléments élastiques ont même montré que l'étirement d'un tel objet sous l'effet de l'étalement pouvait à lui seul expliquer la forme de la courbe de force [Monteiro *et al.*, 2011]. Les mesures d'étalement au niveau du contact avec le substrat, mises en parallèle avec celles de la force de traction, devraient donc nous fournir plus d'informations à ce sujet.

La deuxième section de ce chapitre présentera donc les résultats qui ont trait à toutes ces questions. Nous discuterons ces résultats dans la dernière section.

3.1 Dispositif expérimental

3.1.1 Principe et géométrie du dispositif

Notre dispositif a pour but de mesurer la force de traction développée par une cellule unique s'étalant entre deux plaques de verre, dont l'une est flexible à l'échelle de la cellule et l'autre rigide. En cela, il s'inspire du rhéomètre à cellule unique développé par Atef Asnacios et Nicolas Desprat [Desprat & Asnacios, 2006]. Dans ce système, la force F est déduite de l'équation de Newton pour un ressort : $F(t) = k.\delta(t)$, où k est la raideur de la micro-plaque que l'on aura calibrée et δ la déflexion de la plaque souple que l'on mesure par une méthode optique.

Nous avons couplé ce dispositif de mesure de force à un microscope à ondes évanescentes (TIRF) afin d'imager les processus moléculaires ayant lieu proches de la membrane et qui pourraient être impliqués dans la production de la force de traction. Nous nous intéresserons particulièrement à la formation des patches d'adhésion mais le même système peut aussi être utilisé pour suivre la polymérisation de l'actine ou les éventuels changements d'état de la membrane plasmique.

Le couplage avec le TIRF a nécessité de modifier la géométrie du rhéomètre à cellule unique. En effet, dans cette technique de microscopie, l'objectif doit être en contact avec le substrat à la surface duquel ont lieu les événements à imager. Il était donc naturel que la lamelle constituant le fond de la chambre expérimentale joue désormais le rôle de plaque rigide, la plaque souple venant se poser par-dessus la cellule (Fig 3.1-A). Cependant, ce changement de géométrie implique de modifier la méthode de détection de la force utilisée dans le rhéomètre à cellule unique. En effet, dans ce dispositif, l'image de la plaque souple à travers l'objectif est envoyée directement sur un capteur photo-sensible qui traduit en tension les déplacements effectués par la plaque (Fig 3.1-B). Ce principe ne peut pas être utilisé tel quel dans la nouvelle géométrie puisque les déplacements de la lamelle souple s'effectuent maintenant suivant l'axe optique de l'objectif. Néanmoins, comme le principe de la méthode optique avait largement fait ses preuves, nous avons choisi de conserver et d'adapter cette idée à notre nouvelle géométrie.

Un problème se pose alors : la plaque dont on doit imager les mouvements de côté se situe en général entre 20 et 0 microns du fond de la chambre. Il est donc impossible de faire ces mesures sans couper la chambre dans la largeur (ce qui provoquerait probablement des fuites du milieu de culture). Pour résoudre ce problème d'encombrement géométrique, nous avons donc choisi de déporter le mouvement de la pointe plus haut en ajoutant un coude de quelques millimètres de longueur au bout de nos lamelles. La cellule sera alors disposée avant le coude sur la partie plane de la lamelle et appliquera un déplacement uniaxial de toute la partie coudée, y compris la pointe (Fig 3.2).

3.1.2 Dispositif de détection de la force

Système optique de détection

Nous avons donc mis au point un système d'éclairage permettant d'imager les mouvements de la pointe de la lamelle souple directement à l'aide d'un capteur photo-sensible. La figure 3.2 montre un schéma de principe du dispositif; la figure 3.3-A en montre une photographie. Les chiffres notés (n) font référence au schéma, les chiffres

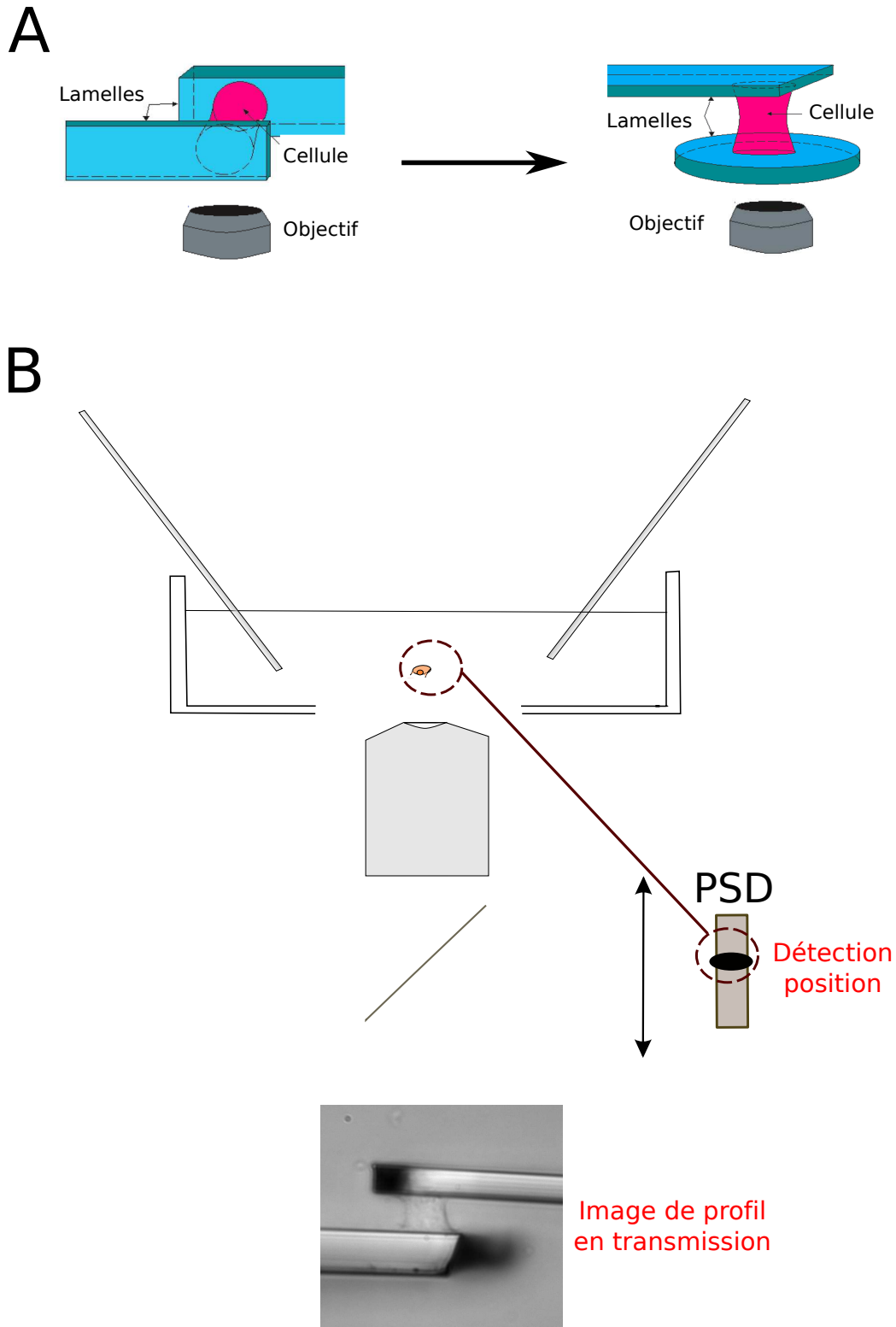


FIGURE 3.1 – A- A gauche, principe du rhéomètre à cellule unique. Une cellule s'étale entre deux micro-plaques de verre et l'expérience est imagée de profil par un microscope inversé classique. A droite, la géométrie du dispositif a été modifiée pour permettre l'imagerie par ondes évanescentes du contact cellule-substrat. B- Principe du rhéomètre à cellule unique. L'image de la lamelle souple est envoyée sur un capteur photo-sensible.

notés (n') font référence à la photographie.

Ce système est constitué d'une lampe (Series 120, X-Cite) normalement utilisée comme lampe à fluorescence (1). Nous l'utilisons ici comme une lampe à lumière blanche classique car elle possède la puissance nécessaire pour notre application. La lumière de cette lampe est dirigée dans un tube optique (InfiniTube Standard, EdmundOptics) (1') contenant une lame oblique semi-réfléchissante (2). Une partie de la lumière est donc orientée vers le bas du tube sur lequel est vissé un objectif 20 X (EdmundOptics) à longue distance de travail (2 cm) (3, 2'). Au bout de cet objectif, nous avons monté une pièce mécanique sur laquelle sont collés deux miroirs. La lumière convergente sortant de l'objectif rencontre ainsi un premier miroir oblique (4) qui la renvoie à 90° dans l'axe parallèle au fond de la chambre expérimentale. Le tube étant connecté à trois micro-manipulateurs (3') il peut parcourir toutes les directions de l'espace pour permettre à l'expérimentateur de focaliser la lumière incidente sur la pointe de la lamelle souple. Cette lumière est ensuite réfléchiée par le dernier miroir (6) disposé perpendiculairement à l'axe optique. Elle peut donc faire le chemin inverse, former une image de la lamelle souple au travers de l'objectif (2,3') et de la lame semi-transparente (2) où une partie d'entre elle ira tout droit vers le détecteur de position photo-sensible (7).

Capteur photo-sensible

Le capteur photo-sensible utilisé est un PSD pour *Position Sensitive Detector* (S3931, Hamamatsu) de forme rectangulaire (6×1 mm). En règle générale, ce type de capteur est utilisé pour l'alignement des fibres optiques. Il permet donc en principe de détecter la position d'un point lumineux le long de son axe principal. Dans ce cas, la lumière frappant le capteur arrache les électrons qui se dirigent alors vers les extrémités du rectangle sous l'effet d'une différence de potentiel constante ; la résistance étant proportionnelle au chemin parcouru par les électrons, ce mouvement induit aux bornes du capteur deux courants dont la différence est proportionnelle à la position du point lumineux.

Dans notre expérience, nous utilisons ce capteur en contraste inverse. Nous détectons en effet la tâche noire sur fond blanc laissée par la boule au bout de la lamelle. Néanmoins le principe de fonctionnement du capteur n'est pas modifié.

Les deux courants en sortie peuvent donc être traduits en tension après avoir été analysés, filtrés et amplifiés par un boîtier électronique (Hamamatsu) conçu pour cet usage. La tension en sortie du boîtier est alors proportionnelle à la position de la tâche sur le capteur. Ce signal est numérisé et transmis dans un ordinateur à l'aide d'une carte d'acquisition (BNC-2110, National Instruments). Il est alors traité et éventuellement enregistré grâce au logiciel *LabView*.

Fabrication des lamelles de verre

Les microplaques de verre que nous utilisons comme senseurs de force sont très similaires à celles employées dans le rhéomètre à cellule unique. Il s'agit de rectangles fins que l'on étire à chaud à l'aide d'une étireuse à capillaire (PB-7, Narishige). Ces lames étirées, dont on peut régler la longueur et donc la raideur en les coupant, sont ensuite greffées à un capillaire cylindrique beaucoup plus rigide afin d'éviter les effets de tension de surface dus au passage de l'interface air-liquide à l'entrée dans le milieu

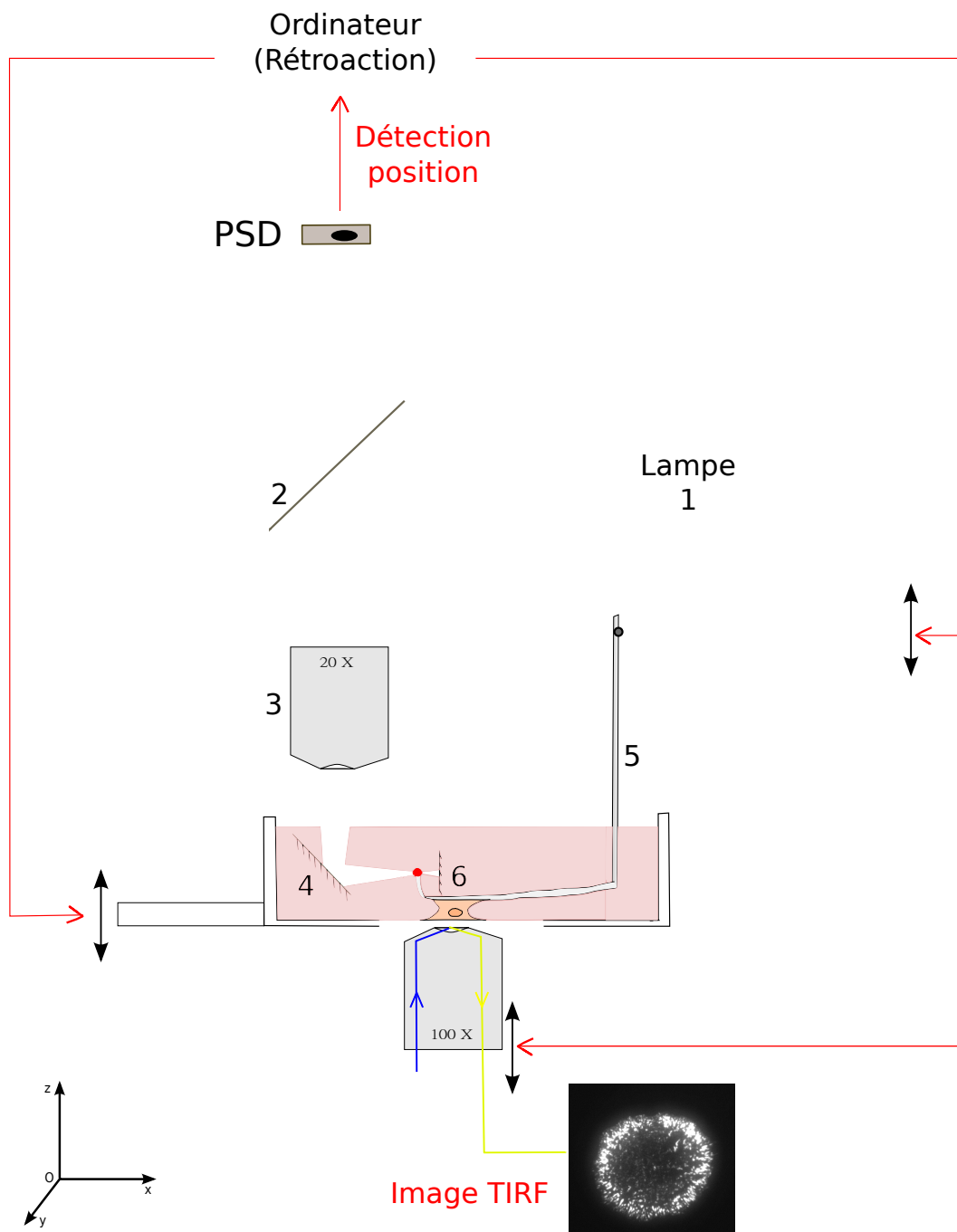


FIGURE 3.2 – Schéma du montage optique permettant la détection de la position de la lamelle souple - (1) Lampe. (2) Lame séparatrice. (3) Objectif. (4) Miroir de renvoi à 90°. (5) Tige support de la lamelle. (6) Miroir de collecte et retour de lumière.

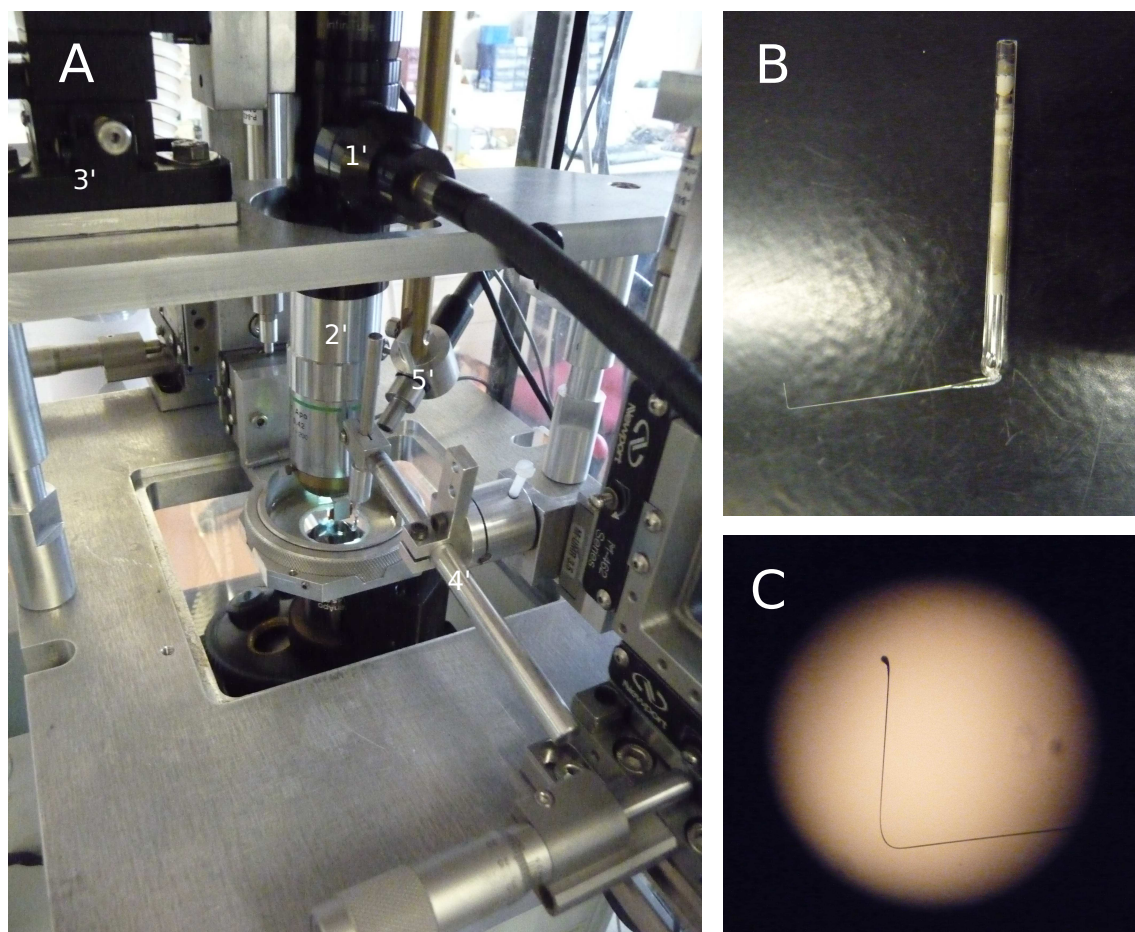


FIGURE 3.3 – A- Photographie d'une partie du dispositif expérimental. (1') Entrée du faisceau lumineux dans le tube optique. (2') Objectif pour la détection de la déflexion. (3') Micromanipulateurs portant le tube optique. (4') Bras porteur de la lamelle. (5') Dispositif d'illumination en lumière blanche. B- Photographie d'une lamelle. Echelle réelle . C- Zoom sur le bout courbé de la lamelle (Grossissement 5X).

de culture. Ce capillaire est connecté à un bras porteur (4') déplaçable précisément sur l'axe (Oz) à l'aide d'un cristal piézoélectrique (PI). L'ensemble est aussi porté par trois micromanipulateurs (M462, Newport) permettant de déplacer la lamelle dans les 3 principales directions de l'espace.

La différence majeure entre ces microplaques et celles de [Desprat & Asnacios, 2006] réside dans la courbure façonnée au bout de la plaque pour convenir au nouveau système de détection. Cette forme est réalisée à l'aide d'une microforge (MF-900, Narishige) qui permet de chauffer la plaque localement. Le verre fond alors du côté de la plaque le plus proche de la résistance, ce qui entraîne une courbure de la plaque sans doute par capillarité. La plaque peut ainsi former un angle de 90° avec sa direction d'origine, la zone courbée s'étendant sur seulement quelques dizaines de microns. Elle est de plus terminée d'une "goutte" sphérique obtenue également par chauffage avec la microforge, que l'on recouvre ensuite d'une colle inerte chimiquement et biocompatible (Silicomet JS 533, Loctite). La présence de cette colle permet de rendre opaque le bout de la lamelle et augmenter ainsi le contraste pour la détection de position.

Le protocole pour la calibration et le nettoyage de ces lamelles est détaillé dans l'Annexe E.

Appareils périphériques

L'ensemble du dispositif (microscope et dispositif de détection) est placé sur une table anti-vibration dynamique (TS-150, TableStable) afin de l'isoler de tous les types de vibrations provenant de l'extérieur (de 0,7 à 1000 Hz), en particulier des vibrations à basse fréquence induites par les mouvements du bâtiment.

Le système est par ailleurs disposé dans la chambre thermalisée à 37°C que nous avons décrite dans le chapitre 2.

Enfin, pour repérer et positionner les lamelles et les cellules au début de l'expérience, le système a besoin d'un éclairage en lumière blanche. Nous utilisons à cette fin une lampe LED (DiCon, FiberOptics Inc) (5'). L'encombrement dû au dispositif de détection de la force nous a empêché de disposer cette lampe dans l'axe de l'objectif du microscope. La lumière incidente arrive donc en biais par rapport à l'axe optique ce qui produit des mouvements apparents des objets dans le plan image lorsqu'on change le point de focalisation suivant l'axe vertical. Cependant, avec un peu d'entraînement, l'utilisateur trouve vite des repères et l'expérience ne pâtit pas trop de ce problème.

Contraintes et performances

Grâce aux travaux réalisés par Axel Guiroy et Démosthène Mitrossilis sur le rhéomètre à cellule unique, nous avons l'avantage de connaître la forme générale d'une courbe de force de traction cellulaire. Nous savons ainsi qu'en moyenne, cette force est nulle pendant environ une centaine seconde après que la cellule ait été placée entre les plaques, puis elle croît proportionnellement au temps pendant environ 15 minutes, jusqu'à atteindre un plateau. L'amplitude maximale de la force dépend de la raideur de la plaque et s'étend de la dizaine de nano-newtons pour une raideur de l'ordre de $1\text{nN}/\mu\text{m}$ à environ 300 nN pour une raideur infinie mimée à partir du système de rétroaction (voir paragraphe suivant) [Mitrossilis *et al.*, 2009]. Ces forces correspondent à des déplacements de la pointe de la plaque de l'ordre de $10\ \mu\text{m}$ maximum.

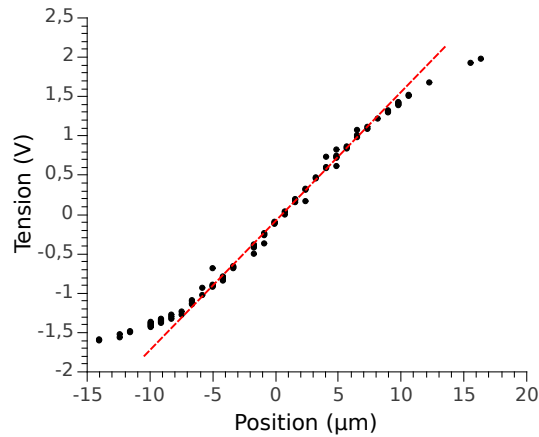


FIGURE 3.4 – Courbe d'étalonnage du capteur photosensible représentant la tension en sortie du capteur en fonction de la position de la pointe.

Ces caractéristiques imposent donc plusieurs contraintes sur notre système de détection. Tout d'abord, le système doit être capable de mesurer des déplacements sur une plage de $10\ \mu\text{m}$ au moins, c'est-à-dire que la tension en sortie du capteur doit être proportionnelle au déplacement de la pointe de la plaque sur une plage de cette taille. La figure 3.4 montre que c'est effectivement le cas ; il suffisait pour cela d'ajuster les tailles relatives de l'image de la pointe de la lamelle souple avec celle du capteur. A noter que cette plage et le facteur de proportionnalité, qui est ici de $0,16\ \text{V}/\mu\text{m}$, change légèrement selon la lamelle utilisée.

D'autre part, l'amplitude des déplacements en question crée une limite sur la résolution de la mesure de position. Autrement dit, l'épaisseur de la courbe de force doit être largement inférieure à l'amplitude de la force. Ainsi, une résolution de $0,5\ \mu\text{m}$ doit être suffisante pour avoir accès à l'évolution de la force. La figure 3.5 montre un zoom sur une courbe de position en fonction du temps illustrant le bruit sur la détection en l'absence de cellule. On observe sur cette courbe des oscillations de période égale à 25 secondes et d'amplitude de $250\ \text{nm}$ environ. Il ne s'agit donc pas d'un bruit blanc qui viendrait de l'électronique ou de vibrations mécaniques. En fait, en mettant en parallèle cette courbe avec la courbe de température en fonction du temps, nous avons compris que ces oscillations étaient dues au dispositif de thermalisation qui oscille autour de sa cible avec une précision de $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Ces variations de température créent des contractions/dilatations du tube optique servant pour la détection, et ainsi des variations relatives de la position relative de la pointe et du capteur. La conséquence de ce phénomène est que la résolution du système est limitée à un quart de micron environ. Cette résolution est largement suffisante pour nos applications, mais on peut voir sur la courbe qu'elle aurait pu être bien meilleure, les bruits électronique et mécanique étant très faibles. De plus, nous verrons par la suite que ces oscillations posent de gros problèmes quand nous utilisons la rétroaction.

Enfin, une autre contrainte importante concerne les dérives du système de détection qui doivent être largement inférieures à l'amplitude de la variation de position pendant la durée d'une expérience (environ 30 minutes), c'est-à-dire de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$

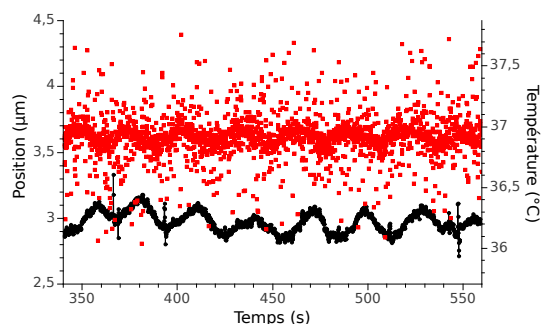


FIGURE 3.5 – Graphe montrant la position de la pointe de la lamelle et la température dans l'enceinte en fonction du temps sur un temps court devant le temps d'une expérience de traction.

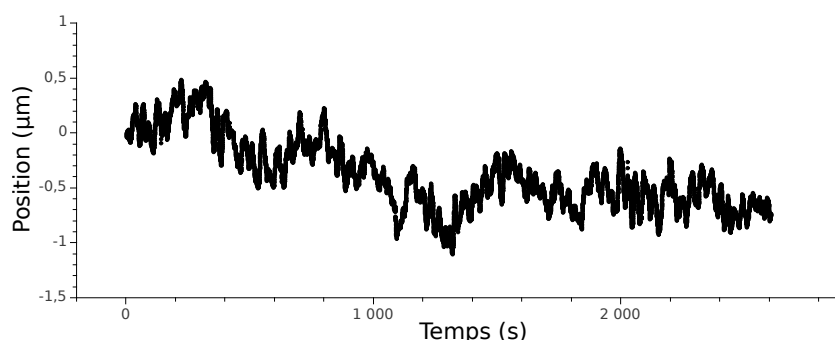


FIGURE 3.6 – Graphe montrant la position de la pointe de la lamelle en fonction du temps en l'absence de cellule pendant une durée similaire à celle d'une expérience de traction.

maximum. Nous n'avons pas réalisé d'étude systématique à ce sujet dans l'état final du système car celui-ci a beaucoup évolué au cours des mois. Cependant, les dérives relevées régulièrement étaient de l'ordre de $1 \mu m$ (voir un exemple typique sur la figure 3.6), avec un maximum à $2 \mu m$, des chiffres qui sont à la limite de l'acceptable. Il est possible que un ou plusieurs des cristaux piézoélectriques de l'expérience soient à l'origine de ces dérives. Quoi qu'il en soit, ces dérives ne montrent pas de sens privilégié, si bien que sur une moyenne de plusieurs expériences l'impact de ces dérives peut être considéré comme négligeable. Ainsi, plusieurs mesures réalisées sur le rhéomètre à cellule unique avec les mêmes cellules montrent des valeurs de force maximale similaires dans les deux systèmes pour différentes raideurs. Ceci est très rassurant quant au bon fonctionnement de l'ensemble du dispositif (calibration des lamelles, détection de position,...).

3.1.3 Interfacage et rétroaction

Rétroaction et raideur variable

Un des objectifs de cette thèse était de mesurer la dynamique des complexes d'adhésion lorsqu'une cellule animale s'étale dans un environnement de raideur variable. Le rhéomètre à cellule unique avait permis à Démosthène Mitrossilis et Atef Asnacios de

développer un algorithme de contrôle constitué d'une double boucle de rétroaction capable de mimer n'importe quelle valeur de raideur. Ils ont ainsi pu modifier en temps réel la raideur ressentie par la cellule au cours de l'étalement et observer l'adaptation de la force de traction à la raideur [Mitrossilis *et al.* , 2010].

Nous avons reproduit ce système dans notre expérience. Le principe de son fonctionnement est le suivant.

Une première boucle de rétroaction permet de maintenir la pointe de la lamelle souple en position fixe de façon à compenser la déflexion induite par la cellule et ainsi avoir accès à la force de traction (Fig 3.7-A). Pour cela, la mesure de position réalisée à l'aide du dispositif de détection est d'abord transmise à un ordinateur, puis un programme Labview envoie un signal au cristal piézoélectrique contrôlant la position du bras porteur de la lamelle (Fig 3.2). Ce signal, transmis par l'intermédiaire d'une carte de sortie (BNC-2110, National Instruments), corrige donc la position à la base de la lamelle souple afin que la pointe reste immobile. Cette position est ainsi réactualisée par un déplacement δ chaque 0,1 seconde soit la résolution temporelle de notre dispositif. Le déplacement total du piézoélectrique ($\Delta = \Sigma \delta(t)$) multiplié par la raideur réelle k de la lamelle correspond alors à la force de traction développée par la cellule ($F = k \cdot \Delta$).

Un autre signal de correction est appliqué à chaque instant à la plaque rigide, matérialisée dans notre expérience par le fond de la chambre expérimentale, qui est déplacée, elle aussi par un cristal piézoélectrique, suivant l'axe de la force de traction (Fig 3.7-A et Fig 3.2). Ce déplacement, que l'on notera D , dépend de la valeur de la raideur choisie par l'utilisateur qui est définie par $k_{eff} = k \cdot \frac{\delta(t)}{D(t)}$.

Ainsi, pour mimer une raideur infinie, la plaque rigide doit être maintenue immobile pendant l'expérience. A l'autre extrême, pour une raideur nulle, la plaque rigide se déplacera de D sans que la cellule n'ait appliqué aucune force (Fig ??-B).

Interfaçage

Au cours d'une expérience, le fonctionnement de certains des appareils précédemment cités nécessitent d'être coordonné. C'est particulièrement le cas pour les dispositifs lumineux. Ainsi, la mesure de la force s'effectue en continu et nécessite l'usage d'une lampe à lumière blanche, ce qui est incompatible avec la prise d'image par le laser qui doit se faire autant que possible dans l'obscurité. La détection de la force et la rétroaction doivent donc être éteintes pour pouvoir prendre une image en TIRF.

Ceci a nécessité la mise en place d'un enchaînement complexe d'ouvertures et fermetures de shutters pilotés simultanément par deux ordinateurs ; l'un est l'ordinateur du microscope muni du logiciel de prise d'images CellM (Olympus) et doté de 3 sorties TTL, l'autre est l'ordinateur auquel sont connectées les cartes d'acquisition, qui peut traiter et enregistrer ces signaux à l'aide du logiciel Labview et appliquer les boucles de rétroaction contrôlant la raideur effective.

3.1.4 Limites du dispositif

Le dispositif tel que nous l'avons présenté possède encore quelques limites plus ou moins handicapantes. Le premier problème et le plus important à l'heure actuelle intervient dans les expériences avec rétroaction où l'on mime une raideur quelconque ou infinie. Nous avons remarqué que les courbes étaient dans ce cas entachées d'oscilla-

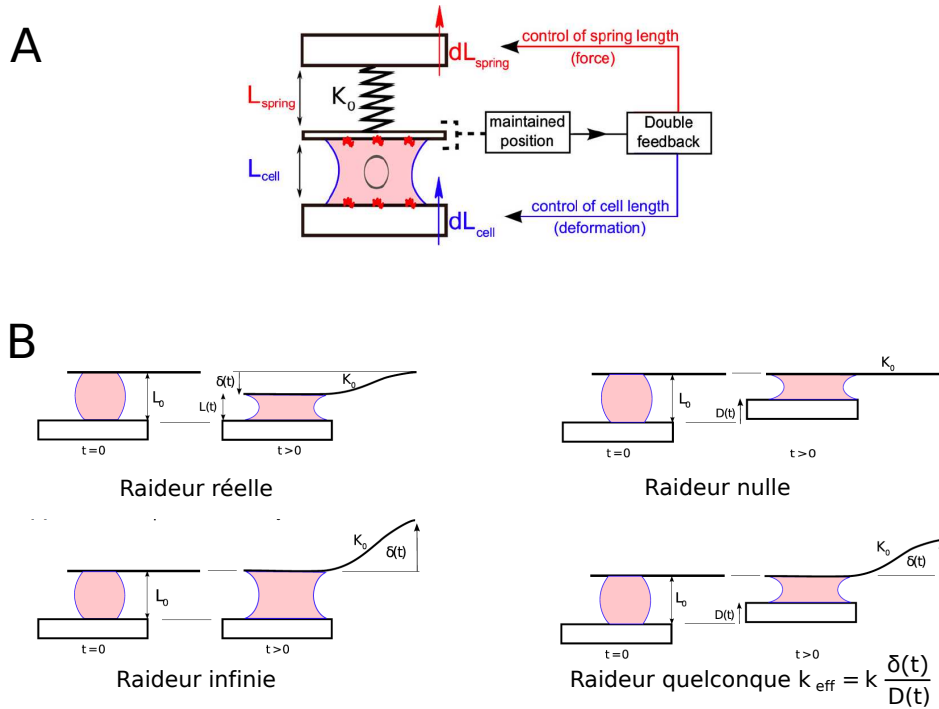


FIGURE 3.7 – A- Schéma de principe du dispositif de traction à raideur variable. B- Schémas montrant le déplacement des lamelles dans les différents cas réalisables avec le dispositif.

tions autour de la valeur moyenne attendue, dont l'amplitude peut atteindre plusieurs dizaines de nano-newtons dans une expérience à raideur infinie, ce qui est très problématique. Ces oscillations corrént en fait avec les oscillations de température du dispositif de thermalisation. Si elles ne sont pas gênantes dans le cas d'une expérience de traction à raideur réelle, ici elles sont amplifiées par la rétroaction. En effet, les déplacements engendrés à la base de la lamelle pour pouvoir maintenir la consigne de position peuvent vite devenir très grands à cause de la cellule qui est attachée aux deux lamelles et qui résiste à ces déplacements. Ce sont donc les forces nécessaires à déformer la cellule de ± 250 nm que l'on mesure lorsqu'on quantifie l'amplitude des oscillations en question.

Pour remédier à ce problème, nous pensons utiliser une thermalisation locale à résistance chauffante et effet Peltier disposée à l'intérieur de la chambre contenant le milieu de culture et les cellules. Ainsi, si la température de la pièce est globalement constante au cours d'une expérience, le système de détection de la force ne devrait être soumis qu'à de faibles fluctuations de température. On pourrait aussi faire en sorte que le système soit aveugle à ces oscillations en diminuant volontairement sa résolution.

Enfin, il faut noter que les expériences sont très difficiles à réaliser avec ce dispositif et demandent beaucoup d'entraînement et de patience à l'utilisateur. La raison principale est l'encombrement du dispositif qui rend les accessoires difficiles à manipuler. Il faut aussi faire attention à attraper les cellules avec la lamelle souple avant qu'elles n'aient commencé à adhérer sur la lamelle du fond afin de ne pas occasionner un étalement dissymétrique entre les deux lamelles.

3.1.5 Procédure expérimentale

Afin d'aider le lecteur à se représenter le déroulement d'une expérience dans ce dispositif, nous décrivons ici les différentes étapes à réaliser par l'expérimentateur.

Les deux lamelles sont d'abord recouvertes d'une solution contenant de la fibronectine, comme dans les expériences du chapitre précédent. Puis la lamelle souple est alignée par rapport à l'objectif du microscope TIRF afin que la cellule, que l'on placera sous la lamelle, soit au centre du champ. Le dispositif de mesure de force (miroirs, tube optique et capteur) est alors positionné au milieu d'une plage où le signal de tension mesuré au niveau du capteur est proportionnel au déplacement de la pointe de la lamelle. Les cellules, toujours des fibroblastes Ref-52 dont la paxilline est marquée avec YFP, sont ensuite déposées dans la chambre expérimentale remplie de milieu. Après sédimentation des cellules, l'expérimentateur en choisit une en déplaçant la chambre, puis il dispose la lamelle souple de façon à effleurer le dessus de la cellule (Fig 3.8). L'enregistrement peut alors commencer : la cellule va s'étaler entre les deux plaques, appliquer une force de traction et éventuellement créer des patchs d'adhésion avec le substrat.

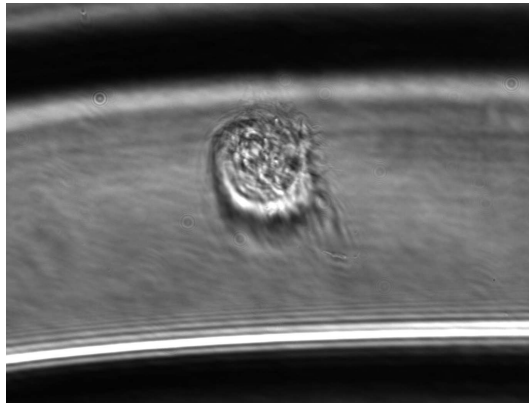


FIGURE 3.8 – Image en lumière blanche montrant la lamelle souple au-dessus d'une cellule au début d'une expérience.

3.2 Résultats expérimentaux

Afin de caractériser l'effet de la raideur sur les différents paramètres de notre problème (force, adhésion, étalement), nous avons réalisé des expériences avec trois raideurs différentes. Deux raideurs appartiennent à la gamme où la contractilité cellulaire varie avec la raideur des micro-plaques ($1,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et $12,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) et la dernière est la raideur infinie, que l'on mime avec le dispositif de rétroaction. Ainsi, nous aurons un aperçu rapide des paramètres qui peuvent s'adapter à la raideur dans notre problème.

Notons d'ores et déjà que les données montrées ici sont le résultat d'un nombre relativement faible d'expériences ($n=12$ pour $k=1,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, $n=15$ pour $k=12,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et $n=13$ pour $k=\infty$) ; cette statistique nécessitera donc d'être complétée.

3.2.1 Observations générales

La figure 3.9 présente une série d'images typique obtenue lors d'une de ces expériences. A la vue de telles images, nous pouvons déjà faire plusieurs remarques importantes. Premièrement, les motifs globaux que l'on avait mis en évidence dans les expériences d'étalement à deux dimensions apparaissent aussi dans la géométrie à deux plaques : au début de l'étalement la surface de contact est homogène, puis une couronne intense de patches de paxilline se forme en périphérie de la cellule.

Cependant, le motif donne l'impression d'avoir subi une homothétie par rapport à la géométrie à 2D. Autrement dit, l'aire de contact est moins grande mais les adhésions aussi sont plus petites. Nous analyserons ces changements géométriques dans le détail au chapitre suivant.

Enfin, un phénomène nouveau apparaît. Dans certaines expériences à raideur infinie, le fond diffus au centre de la cellule devient complètement noir, comme le fond de l'image. Nous attribuons cette observation au décollement de la membrane, lorsque la pression dans le cytoplasme devient inférieure à celle du milieu. Un tel décollement avait déjà été observé au rhéomètre à cellule unique (voir Fig 3.9-B). Il ne se produit qu'aux plus grandes raideurs car dans les autres cas le rapprochement des deux plaques empêche la cellule de prendre une forme compatible avec la dépression.

Etant donné que les principales caractéristiques de la dynamique de la paxilline sont conservées dans cette géométrie, nous avons analysé le phénomène avec les mêmes outils qu'au chapitre précédent. Nous allons donc présenter l'évolution des trois paramètres d'intérêt au cours de nos expériences de traction, à savoir la cinétique de l'étalement, la dynamique des complexes d'adhésion et la génération de la force de traction. Puis nous verrons comment ces trois paramètres sont coordonnés.

3.2.2 Étalement, force et adhésions

Cinétique du rayon cellulaire

La cinétique de l'étalement a globalement la même forme que l'étalement simple à 2 dimensions (Fig 3.10-A). On note une première phase rapide, où le rayon est proportionnel au temps et dont la vitesse moyenne est inchangée autour de $0,028 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ quelle que soit la raideur de la lamelle (Fig 3.10-B). Cette phase a un temps typique t_s^* de l'ordre de 300 secondes mais diminue lorsque la raideur augmente (Fig 3.10-C). Ceci

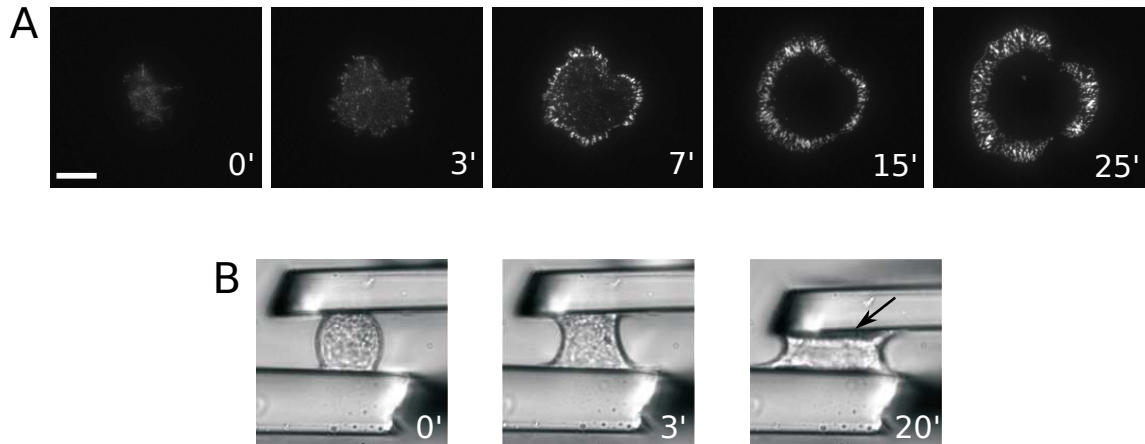


FIGURE 3.9 – A- Images en microscopie TIRF montrant la dynamique de la paxilline au cours de l'étalement d'un fibroblaste Ref-52 entre deux plaques de raideur infinie. Echelle : $10 \mu m$. B- Image en lumière blanche de l'étalement d'un myoblaste C2-7 entre deux plaques de raideur infinie. Vue de profil. La flèche indique le décollement de la membrane au centre. (Les temps sont à titre indicatifs et ne peuvent être comparés rigoureusement.)

est sans doute à l'origine du comportement des rayons de transition R_s^* et du rayon mesuré après 20 minutes d'étalement R_{sat} qui diminuent aussi aux plus grandes raideurs (Fig 3.10-D et E). Il nous manque pour l'instant des informations pour interpréter ces données, nous y reviendrons donc un peu plus loin.

En attendant, on peut retenir que bien que l'ajout d'une deuxième plaque ait modifié quelques grandeurs typiques de l'étalement (diminution du temps de transition et de l'aire finale), la forme globale de l'étalement ne semble affectée ni par le changement de géométrie ni par la raideur de la lamelle.

Génération de la force de traction

Les courbes de force en fonction du temps ont la forme attendue, qui avait déjà été mise en évidence par [Mitrossilis *et al.*, 2009] (Fig 3.11-A) pour des myoblastes C2-7. Ainsi, la force est nulle pendant environ 150 à 200 secondes quelle que soit la raideur¹ (Fig 3.11-B). Puis elle augmente proportionnellement au temps pendant plusieurs centaines de secondes (typiquement 800s). Comme attendu, la pente de cette courbe (dF/dt) augmente avec la raideur de la lamelle tout comme la force maximale générée (Fig 3.11-C et D), avec des valeurs proches de celles mesurées sur les cellules C2-7.

Dynamique des complexes d'adhésion

Bien que le temps auquel elles apparaissent est plus petit que pour l'étalement à 2D, la dynamique des complexes d'adhésions est peu modifiée par l'ajout de la deuxième plaque (Fig 3.12-A). Ainsi, aucune adhésion n'est généralement visible avant un temps typique de 200 secondes. Ce temps semble légèrement diminuer lorsque la raideur de

1. On notera t_f^* le temps où la force moyenne commence à se détacher de la valeur zéro ; ce temps a été déterminé de visu, sans procédure automatique d'analyse de la courbe de force.

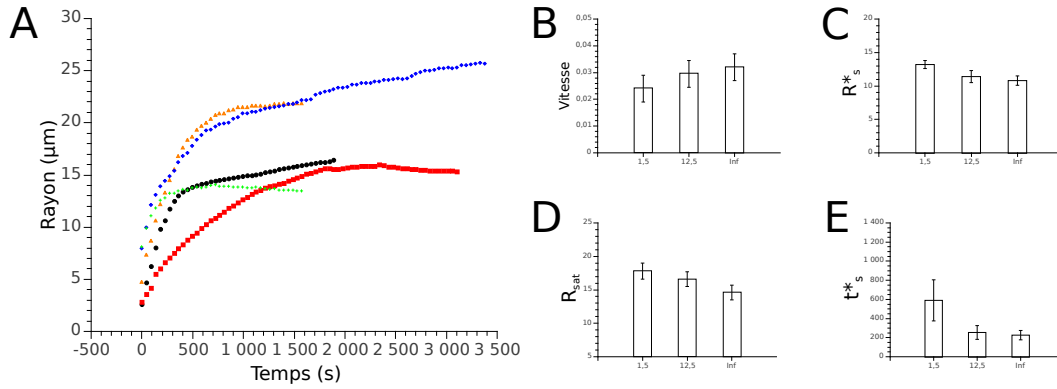


FIGURE 3.10 – A- Graphe montrant le rayon de contact cellule-substrat en fonction du temps sur la lamelle inférieure. Echantillon de 5 cellules comprenant les 3 raideurs utilisées. B à E- Histogrammes de la vitesse d'étalement pendant P1 (B), du rayon de transition de l'étalement (C), du rayon de contact après 20 minutes (D), des temps de transition de l'étalement (E) en fonction de la raideur de la lamelle.

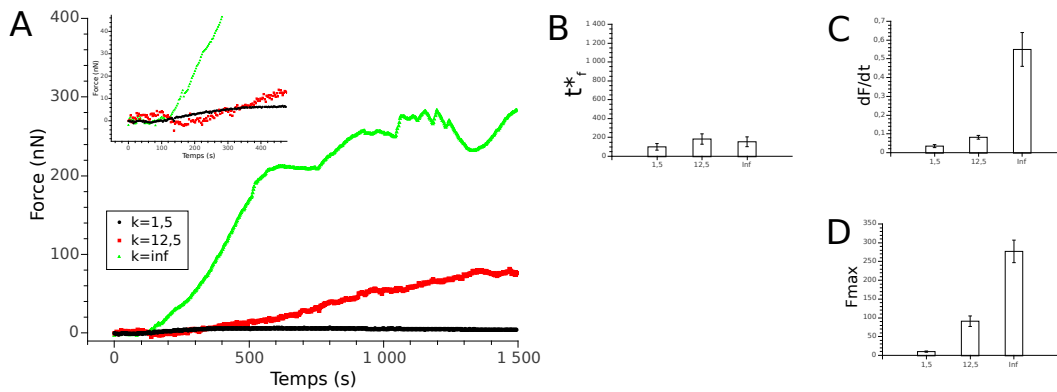


FIGURE 3.11 – A- Trois courbes de force en fonction du temps caractéristiques des trois raideurs testées. En encart, zoom sur les faibles valeurs de force. B à D- Histogrammes du temps d'apparition de la force (B), de l'accroissement de force par unité de temps (C) et de la force au plateau (D) en fonction de la raideur de la lamelle.

la lamelle augmente (Fig 3.12-B), mais cette observation prendra tout son sens lorsque nous comparerons ce temps avec celui où commence à croître la force de traction.

Après cette première phase, une couronne d'adhésion commence à se former en périphérie de la cellule et l'aire d'adhésion augmente proportionnellement au temps. Étonnamment, la pente à laquelle croît cette surface d'adhésion est indépendante de la raideur de la lamelle (Fig 3.12-C). De même, l'aire totale d'adhésion après saturation du processus ne dépend pas de la raideur (Fig 3.12-D), alors que la force de traction (croissance et force maximale) en dépendait fortement. Comme nous nous attendions à une forme d'adaptation de ces patches d'adhésion à la force, et donc à la raideur, nous sommes alors demandé si la densité de paxilline à l'intérieur des patches d'adhésion augmentait avec la raideur. Pour cela, nous avons mesuré l'intensité moyenne à l'intérieur des patches après 20 minutes d'étalement. Comme le montre la figure 3.12-E, aucune tendance notable n'apparaît quand on augmente la raideur.

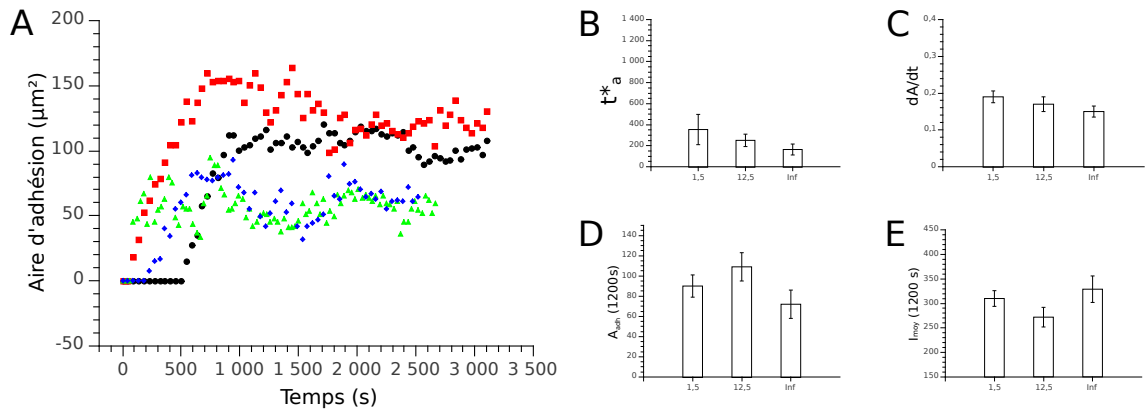


FIGURE 3.12 – A- Graphe montrant l’aire d’adhésion en fonction du temps. Echantillon de 5 cellules. B à E- Histogrammes du temps avant l’apparition des adhésions (B), de l’accroissement de l’aire d’adhésion par unité de temps (C), de l’aire d’adhésion après 20 minutes (D) et de l’intensité moyenne des adhésions après 20 minutes (E) en fonction de la raideur de la lamelle.

Premières conclusions

De ces résultats, nous pouvons déjà tirer quelques enseignements. Premièrement, les deux phases caractéristiques de l’étalement mises en évidence au chapitre précédent semblent conservées ici. En effet, le temps typique auquel apparaît la couronne d’adhésion (200 à 300 secondes) semble coïncider avec celui où l’étalement sort de la première phase. De plus, ce temps correspond aussi au moment où la force de traction commence à augmenter. Nous chercherons donc à déterminer l’enchaînement de ces 3 transitions dans les prochains paragraphes.

D’autre part, nous avons vu qu’après cette phase de latence, la force et l’aire d’adhésion croissent toutes deux proportionnellement au temps. Il sera donc intéressant de savoir sur quelle plage de temps s’effectue cette croissance parallèle et si les deux grandeurs saturent en même temps.

Pour finir, un résultat inattendu ressort de ces mesures. Si la force de traction cellulaire s’adapte bien à la raideur comme on s’y attendait, le comportement des complexes d’adhésion semble totalement indifférent à ce paramètre. La figure 3.13, où nous avons représenté les rapports moyens entre force au plateau et aire d’adhésion à l’équilibre, reflète cette impression. Nous observons ainsi que ce rapport n’est pas conservé : comme la force, il augmente avec la raideur. Ceci semble donc remettre en cause l’idée selon laquelle l’aire des patchs d’adhésion est proportionnelle à la force qui leur est appliquée. Cependant, la valeur trouvée pour une raideur infinie ($8 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$) est très proche de celle mesurée dans plusieurs études précédentes où les auteurs avaient relevé une valeur autour de $5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ [Balaban *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003; Stricker *et al.*, 2011]. On peut donc d’ores et déjà se demander pourquoi cette raideur infinie serait spéciale dans notre expérience. Un premier élément de réponse vient peut-être du fait que cette raideur (définie dans le plan orthogonale au plan des lamelles) correspond aussi à la raideur dans le plan parallèle à celui des lamelles, qui est celle du verre, donc infinie à l’échelle cellulaire. Pour les autres lamelles, les deux raideurs (parallèles et orthogonales) sont différentes.

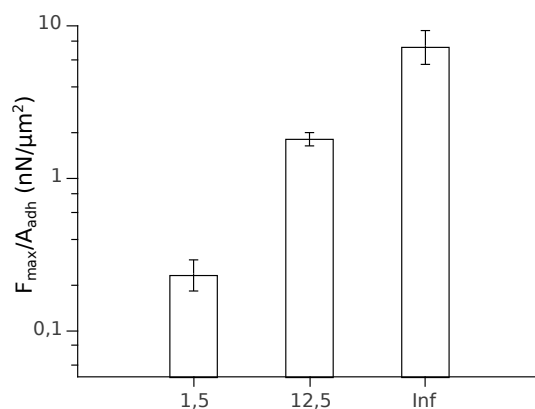


FIGURE 3.13 – Histogramme des rapports moyens entre force de traction et aire d'adhésion à l'équilibre en fonction de la raideur de la lamelle. Attention, l'échelle des ordonnées est logarithmique.

Cependant, afin de mieux comprendre les subtilités se cachant derrière ces résultats, nous examinerons comment force et adhésion se coordonnent dans une expérience de traction où l'on fait varier la raideur en temps réel.

3.2.3 Corrélation entre cinétique de l'étalement et formation des complexes d'adhésion

Une des questions qui restait en suspens après le chapitre précédent était de savoir si le ralentissement de l'étalement est corrélé à la formation des premières adhésions. Nous avons en effet observé que dans une très grande majorité de cas les premières adhésions se formaient avant l'entrée dans la seconde phase d'étalement ; cependant, l'écart entre les deux valeurs était parfois grand et sa distribution très large. Nous nous sommes donc intéressés à la relation entre les deux paramètres dans cette nouvelle géométrie.

La figure 3.14 montre la distribution des différences entre rayon de transition de l'étalement R_s^* et rayon d'apparition des adhésions R_a^* . Plusieurs choses sont remarquables sur cette figure. D'abord, les distributions correspondantes aux trois raideurs utilisées se superposent, ce qui montre que la coordination entre étalement et adhésion est indépendante du paramètre raideur.

Ensuite, on remarque que ces trois distributions sont relativement symétriques (elles reflètent donc une distribution gaussienne) mais globalement larges par rapport à l'amplitude des phénomènes en question, comme dans le cas à 2 dimensions.

Cependant, chose la plus importante, toutes les distributions sont légèrement décalées vers les valeurs positives avec une valeur moyenne globale valant $1,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$.² Ceci indique que l'étalement passe dans la phase P2 légèrement après que les premières adhésions soient apparues. Ces mesures confirment donc celles du chapitre précédent où nous avons déjà remarqué une telle relation dans des conditions de contrôle mais aussi pour des cellules dont la contractilité est inhibée.

2. On notera que cette valeur est inférieure à celle mesurée à 2D, nous analyserons cette subtilité dans le chapitre 4.

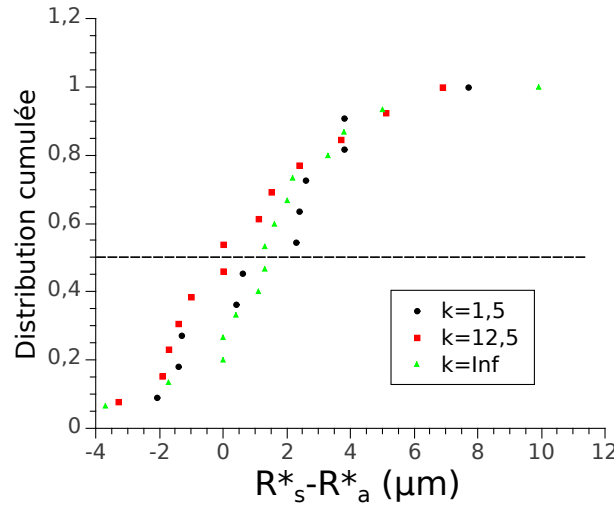


FIGURE 3.14 – Distribution cumulée des différences entre rayon de transition de l'étalement R_s^* et rayon d'apparition des adhésions R_a^* pour plusieurs raideurs k .

3.2.4 Corrélation entre apparition de la force et des adhésions - Effet de la raideur

Après avoir montré que le ralentissement de l'étalement succède à l'apparition des adhésions, il reste, pour parfaire notre scénario, à savoir comment l'apparition de la force se coordonne avec celle des adhésions. Nous avons donc mesuré pour chaque cellule le temps t_a^* précédant l'apparition de la première adhésion et le temps t_f^* auquel la force commence à croître, puis nous avons fait la différence de ces deux temps, en ajoutant à t_a^* un demi-intervalle entre prise d'image ($dt/2$) pour tenir compte du fait que les premières adhésions apparaissent en moyenne à mi-temps entre t_a^* et $t_a^* + dt$. La figure 3.15-A montre la distribution de cette différence pour des lamelles de différentes raideurs. On observe sur cette figure que toutes ces distributions sont légèrement décalées vers les valeurs positives. Il est donc clair que les adhésions apparaissent en moyenne après l'arrivée de la force, et non l'inverse. Mais il apparaît aussi que les trois distributions sont décalées les unes par rapport aux autres. En d'autres termes, les adhésions apparaissent d'autant plus tard après l'arrivée de la force que la raideur est faible.

Afin de comprendre la signification de ces données, il faut aussi prendre en compte la force atteinte au moment de l'apparition des adhésions $F(t_a^* + \frac{dt}{2})$. La figure 3.15-B montre clairement que cette force augmente avec la raideur de la lamelle, ce qui indique que la mise en place des adhésions n'est *pas* déclenchée par un seuil de force.

Cependant, on obtient des choses intéressantes si l'on dispose les éléments précédents sur un même graphe en représentant, pour chaque raideur, $|F(t_a^* + \frac{dt}{2})|$ en fonction de la différence $|(t_a^* + \frac{dt}{2}) - t_f^*|$, qui correspond en fait au temps durant lequel une force a été appliquée sur le substrat avant l'apparition des premières adhésions (Fig 3.15-C).

On observe ainsi que, pour une grande raideur, beaucoup de force est appliquée pendant peu de temps avant que les adhésions apparaissent ; pour la plus petite raideur, au contraire, peu de force est appliquée mais un long temps d'application est nécessaire

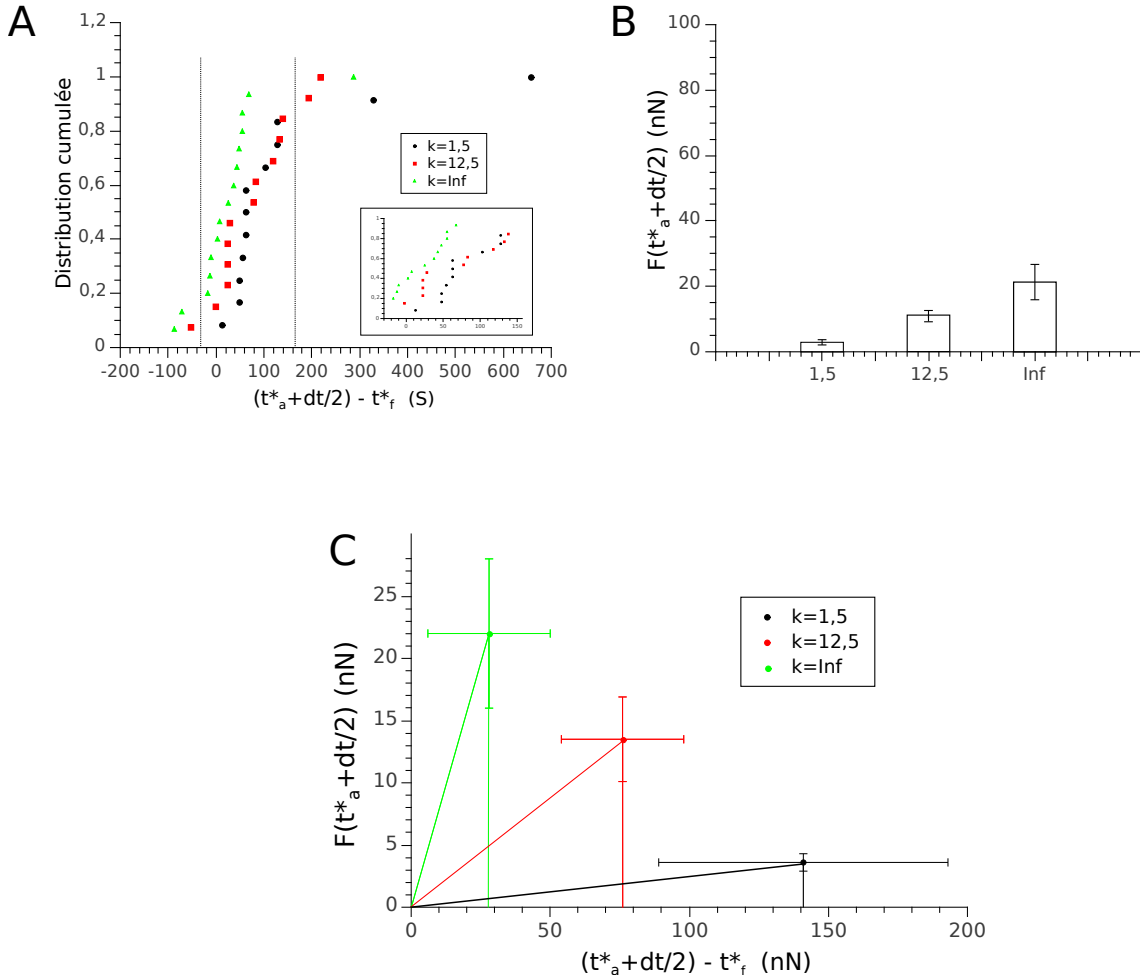


FIGURE 3.15 – A- Distribution cumulée des temps d'application d'une force avant l'apparition des adhésions pour les 3 raideurs utilisées. En insert, zoom sur les valeurs centrales de la distribution. B- Histogramme des forces moyennes atteintes au moment de l'apparition des adhésions en fonction de la raideur. C- Graphe montrant la force moyenne à l'apparition des adhésions en fonction du temps durant lequel cette force a été générée.

pour faire apparaître les adhésions. Enfin, pour la lame de raideur intermédiaire, les deux paramètres prennent des valeurs intermédiaires. Ceci suggère que l'intégrale de la force avant l'apparition des adhésions est conservée quelle que soit la raideur de la lamelle. Malgré la grande incertitude sur les valeurs, le calcul de l'aire de chacun des triangles de la figure 3.15-C nous donne un rapide aperçu de la pertinence de cette idée. On trouve en effet : $I_{1,5} = 508 \pm 212$ nN.s, $I_{12,5} = 1026 \pm 393$ nN.s et $I_{\infty} = 616 \pm 512$ nN.s. Sans doute faudra-t-il calculer l'intégrale pour chaque cellule individuellement pour obtenir plus de précision sur ce résultat ; néanmoins, ces valeurs semblent déjà assez convaincantes compte tenu des grandes erreurs qui entachent nos mesures. De plus, comme nous le verrons dans la discussion, ces mesures sont interprétables dans le cadre de données existantes sur la mécano-sensibilité des adhésions.

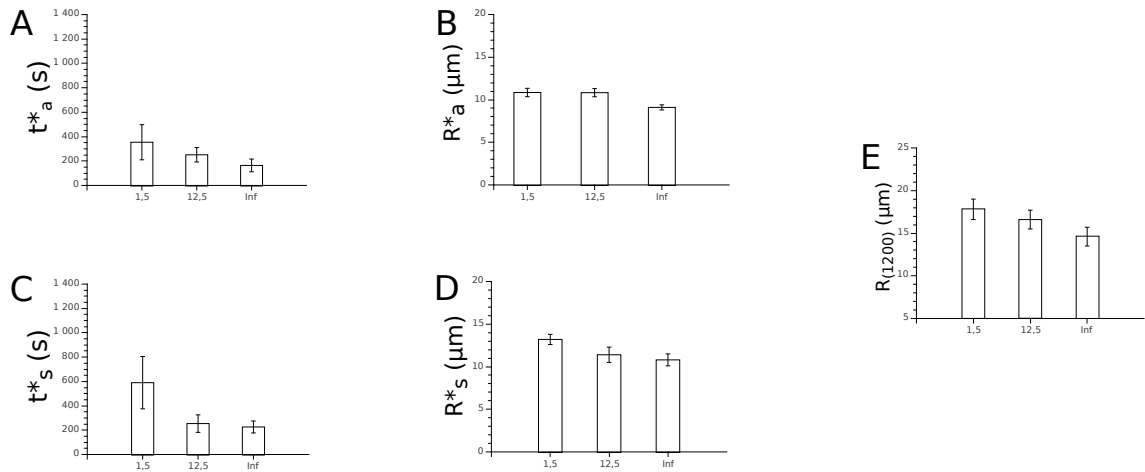


FIGURE 3.16 – A- Histogramme des temps précédant l’apparition des adhésions en fonction de la raideur. B- Rayons cellulaires correspondants. C- Histogramme des temps précédents la transition vers la deuxième phase de l’étalement en fonction de la raideur. D- Rayons cellulaires correspondants. E- Rayons cellulaires après 20 minutes d’étalement en fonction de la raideur.

3.2.5 Variation des paramètres de transition selon la raideur

Un peu plus haut, nous avons mis en évidence de légères variations de certains paramètres de l’étalement (t_a^* , t_s^* , R_a^* ,...) avec la raideur. La figure 3.16 reprend ces différents éléments. Au sortir des dernières analyses, nous pouvons maintenant interpréter ces données.

En effet, nous avons vu que la force apparaît en moyenne au même instant quelle que soit la raideur, mais les adhésions se forment d’autant plus tard après l’arrivée de la force que la raideur est faible. Ceci implique donc que les adhésions apparaissent d’autant plus tard que la raideur est faible (t_a^* diminue lorsque la raideur augmente - Fig 3.16-A). Enfin, comme la raideur n’influence pas le décalage entre apparition des adhésions et ralentissement de l’étalement, ce ralentissement doit avoir lieu d’autant plus tard - et à un plus grand rayon - que la raideur est faible (Fig 3.16-C et D). Ceci est probablement aussi à l’origine du fait que le rayon d’étalement à l’équilibre diminue quand la raideur augmente (Fig 3.16-E), puisque l’étalement est très faible pendant la seconde phase.

3.2.6 Croissance de la force et des adhésions - Expériences à raideur variable

Nous avons vu un peu plus haut que bien que la force de traction (croissance et force maximum) soit adaptée à la raideur, l’aire d’adhésion (croissance et aire maximale) n’est, quant à elle, pas affectée par ce paramètre. Ce résultat est troublant compte tenu des nombreuses autres expériences montrant une mécano-sensibilité des adhésions, nous avons donc voulu vérifier ces résultats issus de valeurs moyennes en modifiant la raideur en temps réel au cours d’une même expérience de traction. Pour cela, nous avons utilisé le dispositif de rétroaction évoqué dans la première section et fait varier la raideur de $1,5 \text{ nN.}\mu\text{m}^{-1}$ à l’infini sur des intervalles de temps de longueurs variables.

Les résultats d’une expérience de ce type sont présentés figure 3.17-A. Ici, comme

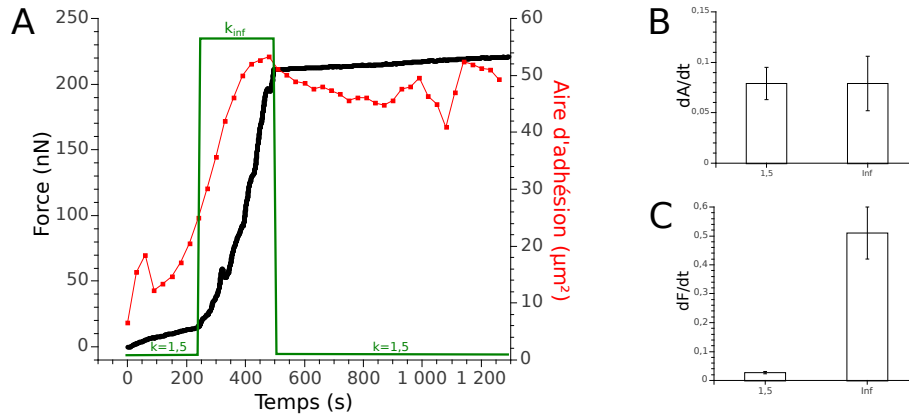


FIGURE 3.17 – A- Graphe montrant la force et l’aire d’adhésion en fonction du temps pendant une expérience à raideur variable. B- Histogramme de l’accroissement de l’aire d’adhésion par unité de temps en fonction de la raideur. C - Histogramme de l’accroissement de force par unité de temps en fonction de la raideur.

dans les autres expériences ($n=13$ cellules), les données ne prêtent pas à confusion : la pente de la force s’adapte à la raideur de manière quasi-instantanée, mais l’aire d’adhésion continue sa course indépendamment des changements de raideurs. Les valeurs moyennes de l’accroissement de force et de l’aire d’adhésion par unité de temps confirment cette impression. Ainsi, les valeurs de dF/dt varient d’un ordre de grandeur entre ces deux raideurs extrêmes et sont les mêmes que dans les expériences à raideur constante³. La moyenne de dA/dt est en revanche identique pour les deux raideurs⁴ (Fig 3.17-B et C). Nous pouvons donc conclure que l’aire d’adhésion ne s’adapte ni à la raideur de la lamelle ni à la force de traction orthogonale au plan des lamelles.

3.2.7 Saturation de la force et des adhésions

Bien qu’il n’y ait pas proportionnalité systématique entre force et adhésion dans nos expériences, nous avons vu dans les paragraphes précédents qu’il existe une coordination entre l’apparition de la force et des adhésions, à la suite de quoi toutes deux croissent proportionnellement au temps. On peut alors se demander sur quelle plage de temps cette croissance parallèle a lieu, ou encore, pour le formuler autrement, si la saturation des deux processus est elle aussi coordonnée dans le temps. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré pour chaque cellule, les temps t_{Fsat} et t_{Asat} auxquels la force et l’aire d’adhésion sortent de la phase linéaire.

La figure 3.18 montre la distribution cumulée de la différence $t_{Asat} - t_{Fsat}$ pour chaque cellule. Nous remarquons tout d’abord sur cette figure que les distributions correspondant aux deux plus grandes raideurs ($12,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et Inf) sont très semblables, tandis que celle correspondant à la plus petite raideur ($1,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$)

3. Le fait que dF/dt soit inchangé pour $k=1,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ selon que l’expérience se déroule à raideur réelle ou mimée valide au passage le bon fonctionnement de notre dispositif de rétroaction.

4. On note au passage que la valeur de dA/dt mesurée ici est environ deux fois inférieure à celle présentée plus haut pour les expériences à raideur constante. L’explication vient du fait que nous avons mesuré ici dA/dt sur chaque segment où la force augmente linéairement avec le temps ; cela comprend donc certains segments où l’aire d’adhésion a déjà saturé.

diffère des deux premières. Nous allons donc analyser cette dernière à part à la fin.

Pour les plus grandes raideurs, nous observons que pour la grande majorité des cellules (plus de 75 %) la force sature après les adhésions. Le décalage moyen est de l'ordre de 100 à 200 secondes, et la distribution est assez bien piquée autour de cette valeur moyenne avec un grand nombre de cellules entre -400 et 0 secondes. Ces résultats révèlent donc que la croissance de la force et de l'aire d'adhésion est globalement coordonnée et que les adhésions saturent avant la force. Ainsi, si la force était nécessaire pour la création des premières adhésions, il est possible qu'un manque de protéines adhésives empêche la force de continuer sa croissance et soit à l'origine de la saturation de la traction. Il serait légitime alors de se demander si l'étalement est également stoppé par une limitation du nombre de protéines d'adhésion disponibles. Malheureusement, comme on peut le voir sur la figure 3.10-A, il est très difficile de définir un critère objectif marquant la saturation de l'étalement.

Mais intéressons nous maintenant à la distribution de $t_{Asat} - t_{Fsat}$ pour $k=1,5$ $nN.\mu m^{-1}$. Celle-ci diffère des deux premières, d'abord parce qu'elle n'est pas gaussienne, et ensuite parce que la quasi-intégralité des valeurs est positive. Autrement dit, la force sature ici avant l'aire d'adhésion. On peut expliquer ce résultat par le fait que pour des raideurs très faibles, la grande vitesse de traction implique que la cellule ramène très rapidement la lamelle souple au contact de la lamelle rigide. La cellule peut alors continuer de s'étaler (et éventuellement faire des adhésions) mais la force sature parce que la cellule est incapable de défléchir plus la lamelle à cause de l'encombrement stérique probablement créé par les organelles et le noyau.

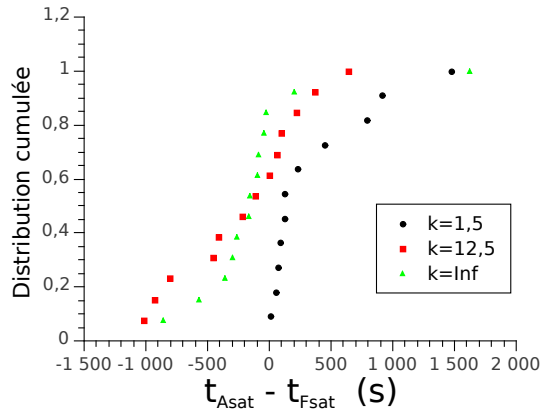


FIGURE 3.18 – Distribution cumulée de l'intervalle de temps entre saturation de la courbe d'adhésion et de la courbe de force pour les différentes raideurs utilisées.

3.3 Discussion et perspectives

La question de la coordination entre la force de traction et la formation des adhésions chez les cellules animales fait débat. Elle est pourtant d'une importance cruciale pour comprendre l'étalement mais aussi la migration et tous les phénomènes de mécanosensibilité des cellules. C'était le but de cette thèse que de s'attaquer à cette question au travers de mesures de la force de traction d'une cellule s'étalant entre deux plaques. Dans sa thèse avec Atef Asnacios, Démosthène Mitrossilis avait déjà remarqué qu'il existe un lien, dans ce type d'expérience, entre forme du corps cellulaire et force de traction. Ici nous avons cherché à corrélérer l'aire des complexes d'adhésion et l'étalement de la lamelle à l'avant du corps cellulaire avec la génération de force.

Les résultats obtenus à la fois complètent et confirment ceux obtenus au chapitre précédent et ceux de Démosthène. Il faut toutefois noter que toutes nos interprétations proviennent d'analyses réalisées sur une plaque seulement, en l'occurrence la plaque rigide. Nous faisons cependant l'hypothèse que le comportement est en moyenne le même sur la plaque supérieure. En effet, la force de réaction du ressort, qui est égale à la force de traction de la cellule, est transmise de proche en proche par action-réaction à travers toute la cellule, puisque celle-ci est un milieu continu. Elle est donc *a priori* la même au niveau de la plaque souple et de la plaque rigide, bien que celle-ci ne subisse aucune déflexion. Par ailleurs, la raideur sondée localement par le lamellipode ou d'éventuelles protéines mécanosensibles est la même sur les deux lamelles, c'est-à-dire celle du verre.

3.3.1 Discussion

Nous pouvons maintenant proposer un scénario quasi-complet décrivant la manière dont les cellules adhérentes parviennent à produire une force de traction durant l'étalement entre deux micro-plaques. La figure 3.20 présente un résumé graphique des différentes étapes de ce processus.

Dans un premier temps, une protrusion pleine d'actine s'extraie du corps cellulaire encore rond et s'étale rapidement. Pendant ce temps, aucune adhésion mature n'est visible et on n'observe aucune force de traction. Le temps de cette première phase (environ 200 secondes) est inférieur à celui mesuré pendant l'étalement à deux dimensions, sans doute à cause de l'ajout de la deuxième plaque.

Puis, lorsque le corps cellulaire prend une forme cylindrique, la cellule commence à appliquer une force de traction ; c'est ce que nous avons vu à la fin du chapitre précédent. Puis après un temps et à un niveau de force dépendant de la raideur, les premières adhésions commencent à se former en périphérie de la cellule. L'apparition d'adhésions matures et de forces de traction non-nulles passent donc par un étalement conséquent qui nécessite, d'une part, une poussée suffisante du front d'actine en contact avec le substrat, d'autre part, un environnement adhésif assez étendu.

Succédant la formation de ces premières adhésions, l'étalement ralentit et entre dans sa seconde phase, comme dans le cas à 2D. Suit alors une phase où la force et l'aire des patchs d'adhésion croissent tous deux en parallèle, proportionnellement au temps. La cellule possède alors une forme similaire à une caténoïde, le corps cellulaire étant moins large au centre qu'au contact des plaques. Cette phase de croissance se termine plus tôt pour les patchs d'adhésion que pour la force, ce qui suggère qu'une limitation

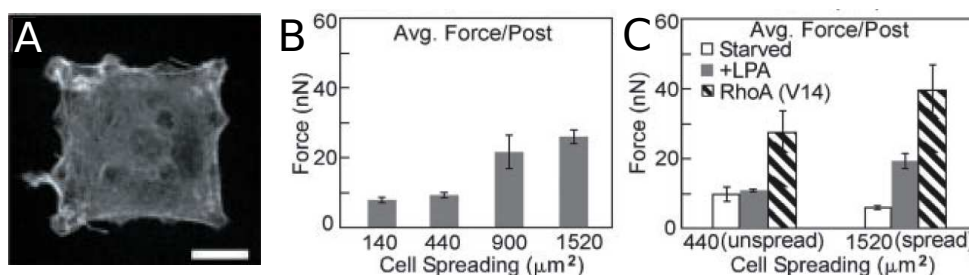


FIGURE 3.19 – A- Image en microscopie confocale d’une cellule de muscle lisse sur un substrat de micro-piliers. L’actine filamenteuse est marquée. Echelle : 10 μm . B- Force moyenne par piliers en fonction de l’aire de contact cellule-substrat. C- Variation de la force en fonction de l’activité contractile pour des cellules étalées et non-étalées (Starved = absence de sérum, +LPA=contractilité stimulée, RhoA= sur-expression de RhoA) [Tan *et al.* , 2003].

de protéines d’adhésion disponibles pourrait être à l’origine de la saturation de la force.

Jusqu’ici, nos mesures sont donc compatibles avec celles effectuées par [Stricker *et al.* , 2011] (resp. [Balaban *et al.* , 2001]), qui observèrent à l’échelle de l’adhésion que la taille de l’agrégat est proportionnelle à la force transmise en ce point pendant la croissance (resp. décroissance) de cette dernière. A raideur infinie, nous retrouvons même une valeur de contrainte par adhésion très proche de celles qu’ils mirent en évidence.

De plus, ce scénario, qui souligne l’importance d’une forme adéquate pour la production de force et la formation des adhésions, corrèle tout à fait avec les données obtenues en statique par [Tan *et al.* , 2003]. Ces auteurs placèrent des cellules de muscles lisses sur des substrats de piliers déformables tout en contrôlant leur étalement. Ils observèrent alors que pour des cellules ”non-étalées”, très peu de force est mesurable au niveau des piliers⁵, puis cette force croît de manière non-linéaire avec l’étalement des cellules (Fig 3.19-B). On peut donc penser que la terminologie ”étalées” et ”non-étalées” dans cet article correspond en fait à un angle de contact ayant passé ou non le cap des 90°, ce qui irait dans le sens de nos observations. De plus, dans les deux cas (”étalées” et ”non-étalées”), cette force s’accorde avec la contractilité cellulaire (Fig 3.19-C).

Cependant, l’emploi de lamelles de raideurs variables nous a montré que le facteur de proportionnalité entre force et taille des adhésions varie selon la raideur. En effet, la force maximale et le taux d’accroissement de force s’adaptent manifestement à ce paramètre, mais ce n’est pas le cas de l’aire de la couronne d’adhésions à l’équilibre ni de la vitesse de croissance de cette couronne. Ces mesures semblent donc contradictoires avec celles de [Balaban *et al.* , 2001], mais aussi avec nos propres mesures puisque nous avons vu au chapitre précédent que l’aire des adhésions est directement proportionnelle à la concentration en myosines II actives dans les cellules, laquelle contrôle aussi l’amplitude de la force de traction [Mitrossilis *et al.* , 2009].

Par ailleurs, autre point étonnant, nous avons vu que l’apparition des adhésions

5. On peut interpréter la force résiduelle sur les cellules non-étalées comme le résultat d’une tension de ligne générée par la forme carrée non-optimale que sont contraintes de prendre les cellules sur le réseau de piliers (Fig 3.19-A).

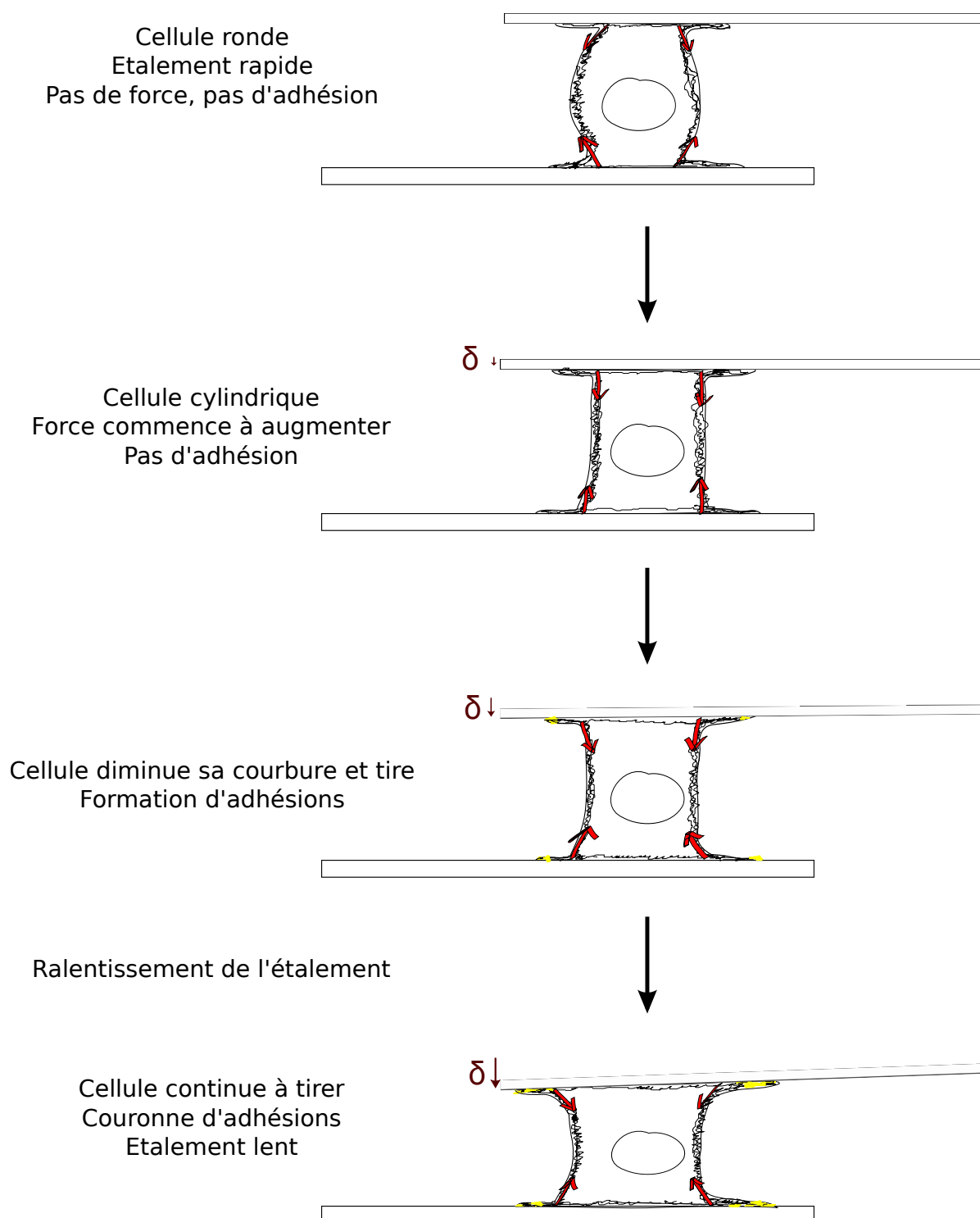


FIGURE 3.20 – Modèle présentant les différentes étapes et acteurs qui interviennent pendant la traction d'une cellule s'étalant entre deux plaques.

dépend de la raideur à travers deux paramètres, à savoir le moment et la force auxquels elles apparaissent. Ainsi, nous avons montré qu'aux faibles raideurs, cette couronne apparaît plus tard après le début de la croissance de la force mais pour une force plus faible, tandis que pour les grandes raideurs, la couronne apparaît peu après le début de la croissance de la force mais pour une force plus grande. Cependant, comme nous l'évoquions plus haut, le taux d'accroissement dA_{adh}/dt de l'aire des adhésions ainsi que leur taille à l'état final sont indépendants de la raideur de la lamelle et donc de la force, puisque celle-ci s'adapte fortement à la raideur dans la gamme testée.

Le premier point est donc compatible avec les modèles invoquant le dépliement de protéines mécano-sensibles présentes dans les sites d'adhésion comme origine de la croissance de ces agrégats [Bruinsma, 2005; Nicolas *et al.*, 2004]. Selon eux, ce dépliement induirait l'ouverture de sites cryptiques de phosphorylation entraînant ainsi une cascade de signalisation modulée par la raideur du substrat. Ainsi, sur substrat mou, le substrat serait déformé par les forces internes à la cellule et les protéines mécano-sensibles se déplieraient peu ; sur substrat dur au contraire, le substrat serait très peu déformé et les protéines subiraient un allongement important. À première vue nos mesures sont cohérentes avec l'hypothèse additive que sous-entendent de tels modèles. En effet, afin de passer le seuil de détection des adhésions, il faut qu'un nombre conséquent de paxillines aient été recrutées. Ce recrutement peut avoir lieu soit en présentant un petit nombre de sites phosphorylés (synonyme de force faible), auquel cas un temps long sera nécessaire pour que la signalisation orchestrant le recrutement se mette en place, soit en présentant un grand nombre de sites phosphorylés (synonyme de force importante) par unité de temps, auquel cas un recrutement suffisant s'opérera rapidement. On peut alors imaginer que c'est l'intégrale de la force au cours du temps qui est conservée dans ce processus, comme semblent l'indiquer nos mesures.

Cependant, le reste de nos mesures contredit cette idée. En effet, un tel mécanisme devrait donner lieu à un taux de croissance et une taille finale de la couronne d'adhésion dépendant de la raideur. Or, ce n'est pas du tout ce que nous observons. En effet, ces deux paramètres sont indépendants de la raideur, et bien qu'adhésions et force croissent en parallèle pendant une partie de l'étalement, ces deux paramètres ne sont pas systématiquement proportionnels.

Alors, comment réconcilier toutes ces observations *a priori* contradictoires en un schéma cohérent ?

L'hypothèse qui semble la plus vraisemblable est que les deux structures (adhésions et cortex) sont toutes deux mécano-sensibles mais à des échelles différentes. Ainsi, le cortex, qui constitue le lien physique entre les plaques parallèles, répondrait à la raideur de nos micro-plaques en adaptant sa force de traction dans la direction orthogonale à l'étalement ; quant aux adhésions, elles répondraient à la rigidité locale du substrat, qui est dans notre cas invariable puisqu'il s'agit du verre, au niveau de la lamelle et du lamellipode.

Mais ces réponses semblent toutes deux modulées par l'activité de la myosine II. Ainsi, l'amplitude de la force de traction durant l'étalement entre deux plaques dépend du nombre de myosines II actives [Mitrossilis *et al.*, 2009]. De la même manière, il est possible que la réponse quasi-instantanée des cellules aux variations de raideur effective soit due à la contraction du cytosquelette d'acto-myosine. Ces deux propriétés

peuvent s'expliquer, soit par le fait que la myosine confère une raideur effective au cortex d'actine, cette raideur se comparant alors à celle des plaques dans les expériences à raideur variable [Marcq *et al.* , 2011], soit au travers d'un mécanisme d'adaptation à la charge comme observé dans le muscle [Mitrossilis *et al.* , 2009].

A l'échelle plus locale, nous savons que les adhésions poussent à la bordure du lamellipode et que leur maturation dépend de la myosine II [Choi *et al.* , 2008]. Il se peut alors, que durant l'extension du lamellipode et la formation d'une nouvelle adhésion, la tension acto-myosine dans la partie de la lamelle située entre la nouvelle adhésion et les anciennes soit comparée à la rigidité locale du substrat, ici le verre. Cette rigidité infinie induirait donc dans notre cas des forces maximales conduisant à un recrutement saturant. Cette idée est d'ailleurs en accord avec le fait qu'on retrouve une force par surface adhésive cohérente avec les études sur gel mou [Balaban *et al.* , 2001] uniquement lorsque nous mimons une raideur infinie dans le sens orthogonal à l'étalement.

Un tel scénario, impliquant un découplage entre les compartiments, est donc vraisemblable au vu de la littérature et il ne remet pas en cause le fait que force et adhésion apparaissent quasi-simultanément et croissent en parallèle. En effet, le changement de forme du corps cellulaire se traduit par une transmission de la tension du cortex vers la lamelle, induisant la maturation des premières adhésions. Ces points d'ancrage transfèrent ainsi la tension vers le substrat et permettent à l'étalement de se poursuivre pendant que la tension dans le cortex (*i.e* la force de traction) continue d'augmenter. Le cycle peut alors se perpétuer avec une nouvelle extension lamellipodiale à l'avant, la création de nouvelles adhésions, etc.

On peut toutefois s'interroger sur le fait que le décalage temporel entre l'apparition de la force de traction et des adhésions augmente quand on diminue la raideur. Nous envisageons deux possibilités pour expliquer cette observation. La première serait que les premières adhésions ressentent effectivement la force de traction dans la direction orthogonale et s'y adaptent de la manière que nous avons décrite plus haut. Les adhésions suivantes seraient ensuite protégées par celles déjà formées et leur croissance ne dépendrait alors que de la rigidité locale. Mais un scénario plus plausible serait le suivant. Étant donné que la distance entre les plaques flexibles est plus ou moins réduite selon la raideur considérée pendant un même intervalle de temps, la forme prise par la cellule au moment de l'apparition des adhésions va aussi changer selon la raideur. Ainsi, il est possible que la projection de la tension sur l'avant de la lamelle soit plus lente à se faire lorsque la cellule est capable de défléchir la lamelle dans le plan orthogonal à l'étalement, c'est-à-dire si l'angle de contact cellule-substrat évolue plus lentement (voir discussion chapitre 4).

Il faut toutefois noter qu'en règle générale ce découplage entre les deux échelles de l'environnement mécanique n'existe pas ; ici c'est notre système expérimental très particulier qui le permet et révèle au passage cette compartimentation. Ainsi, il est probable qu'*in vivo*, cortex et lamelle répondent de manière identique, ces deux structures étant toutes deux tendues le long du même substrat. Les observations expérimentales montrant des forces de traction et des adhésions moins développées sur substrats mous vont d'ailleurs dans ce sens.

Terminons cette discussion par une dernière remarque. Avant nos mesures, certains modèles avançaient l'hypothèse selon laquelle la formation de patchs adhésifs pouvait

être à l'origine d'un accroissement de contractilité à travers l'activation de voies de signalisation [Price *et al.* , 1998; Sawada *et al.* , 2006]. Nos expériences contredisent ce type modèles puisque statistiquement la force de traction y précède la formation des premiers complexes d'adhésion. De plus, tandis que la force est nettement adaptée à la raideur de la lamelle, la croissance des complexes d'adhésion est indépendante de ce paramètre, ce qui indique que le regroupement de protéines adhésives ne décide pas forcément de l'amplitude de la force de traction. Toutefois, ceci n'exclut pas que sur des échelles de temps plus longues, l'organisation du système d'adhésion ne rétroagisse sur la contractilité cellulaire.

3.3.2 Perspectives

Inhibition de la contractilité acto-myosine

Une première expérience évidente pour clore notre série de mesures serait de mesurer la traction et la dynamique des adhésions de cellules dont la contractilité est inhibée. Nous avons ainsi réalisé quelques mesures préliminaires à raideur infinie en plaçant les cellules dans du milieu contenant $8 \mu M$ de Y-27632, l'inhibiteur de contractilité que nous avons employé au chapitre 2.

Les premiers résultats tendent à montrer que la force et l'aire des complexes d'adhésion décroissent substantiellement avec ce traitement. Cependant, il apparaît que les forces atteintes peuvent être plus importantes que celles mesurées avec une lamelle de raideur $1,5 nN.\mu m^{-1}$ sur des cellules de contractilité normale, alors que l'aire d'adhésion est ici nettement inférieure. Ceci serait une nouvelle preuve que la taille des complexes d'adhésion n'est pas systématiquement proportionnelle à la force transmise au substrat mais plutôt un indicateur de la tension interne à la cellule.

Etirement de la cellule pendant la traction

Afin de tester quel impact a l'application d'une force extérieure sur les complexes d'adhésion, nous pouvons appliquer un étirement sur la cellule par exemple en déplaçant la lamelle rigide d'une longueur donnée. Ainsi, nous pouvons comparer cet effet à celui de la force de traction générée par la cellule elle-même.

Nous avons réalisé 4 expériences de ce type jusqu'à présent en appliquant une rampe de $10 \mu m$ sur une période de 100 à 300 secondes. Il faudra évidemment compléter cette statistique, mais les résultats obtenus jusqu'ici (comme celui présenté Fig 3.21) ne montrent pas d'adaptation des complexes adhésifs à cette déformation de la cellule. Par contre, la force mesurée est bien transmise jusqu'à la lamelle souple et une augmentation de dF/dt peut être observée pendant l'application de la rampe.

Revêtement de faible rigidité sur la lamelle du fond

Une dernière idée serait de réaliser les mêmes expériences que nous avons présentées dans ces deux derniers chapitres en recouvrant la lamelle rigide d'un gel souple déformable par les cellules, par exemple en poly-acrylamide. Ceci nous permettrait d'observer comment s'adaptent la cinétique de l'étalement, et la force de traction lorsque la cellule s'étale sur un substrat déformable dans les deux directions (tangentielle et orthogonale au plan d'étalement). Mais surtout, nous pourrions savoir si la taille des

complexes d'adhésion s'adapte à la rigidité locale du substrat cellulaire, contrairement à ce que nous avons observé avec nos lamelles de verre.

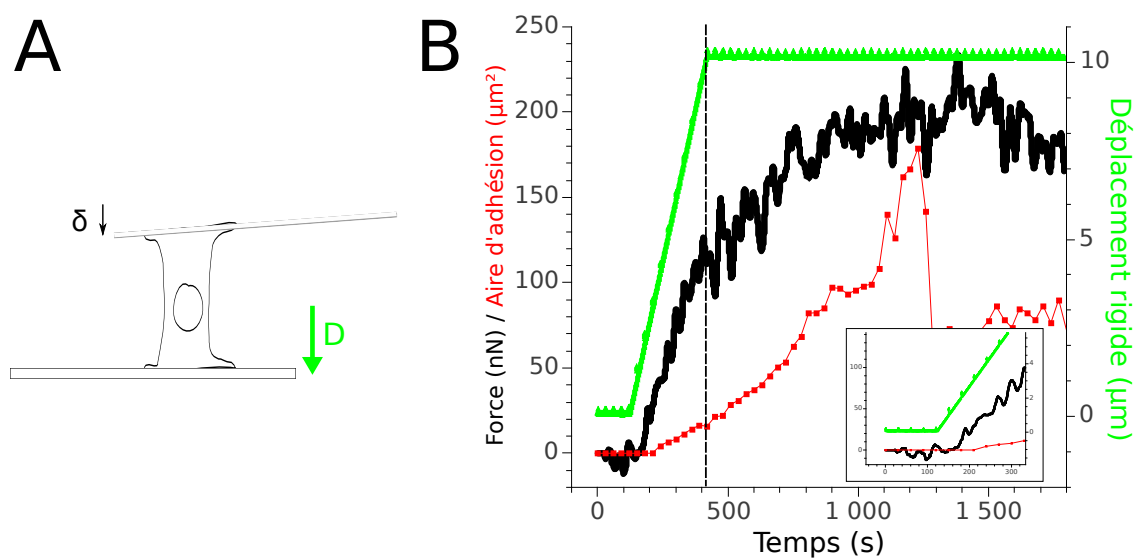


FIGURE 3.21 – A- Principe d'une expérience d'étirement et mesure de force simultanés. B- Graphe montrant la force et l'aire d'adhésion en fonction du temps pendant l'application d'une rampe sur la plaque rigide. En insert, zoom sur les premiers instants de l'expérience.

CHAPITRE 4

Comparaison entre étalement cellulaire sur substrat plan et entre deux plaques

Sommaire

4.1	Résultats expérimentaux	145
4.1.1	Observations générales	145
4.1.2	Première phase et transition de l'étalement	146
4.1.3	Croissance des adhésions et état final	147
4.2	Discussion et perspectives	148
4.2.1	Discussion	148
4.2.2	Perspectives	149
4.3	Résumé des résultats obtenus dans les chapitres 2,3 et 4	152

Au cours de ce chapitre, nous comparerons les différentes caractéristiques de l'étalement et la distribution des patchs d'adhésion sur substrat plan et entre deux plaques. Nous savons depuis le premier chapitre que la géométrie de l'environnement peut influencer la vie des cellules animales. Des motifs adhésifs de tailles variables ont jusqu'ici été employés pour démontrer ces effets. L'originalité de notre expérience, par rapport à ces précédentes études, est que nous doublons ici la surface adhésive disponible sans pour autant la limiter. Plus précisément, la cellule doit ici engager deux processus d'étalement, sur deux surfaces différentes, simultanément.

Bien que ce travail ne faisait pas partie des objectifs premiers de notre thèse, il revêt *a posteriori* un intérêt à plusieurs niveaux. En effet, obliger ainsi la cellule à s'étaler sur deux surfaces simultanément devrait nous aider à parfaire notre modèle d'étalement et éventuellement à déterminer les paramètres importants à inclure dans un schéma théorique décrivant ce phénomène. En outre, nous allons pouvoir observer quel effet peut provoquer cette géométrie à deux plaques, plus proche de celle que rencontrent les cellules *in vivo*, sur la forme cellulaire et la répartition des complexes d'adhésion.

4.1 Résultats expérimentaux

4.1.1 Observations générales

Nous comparons ici l'étalement et la dynamique des complexes d'adhésion lors d'expériences sur une surface plane et entre deux plaques de verre. Nous réunissons pour cela les données présentées dans les deux chapitres précédents, obtenues sur des fibroblastes Ref-52 dont la paxilline est marquée avec YFP. Notons bien que dans le cas de l'étalement entre deux plaques, la microscopie TIRF ne permet l'observation de l'étalement que sur la plaque en contact avec l'objectif. C'est pourquoi lorsque nous quantifierons les paramètres caractéristiques de l'étalement des cellules entre deux plaques, les chiffres indiqués concerneront uniquement la plaque inférieure.

La figure 4.1 présente deux expériences typiques des deux géométries. La première chose que l'on remarque immédiatement est que l'aire de contact visualisée après 15 minutes est moins grande lorsque la cellule est disposée entre deux plaques que sur une seule. On remarque aussi que la couronne d'adhésion a l'air plus développée après 3 minutes entre deux plaques. Nous avons donc voulu quantifier ces phénomènes en reprenant les grandeurs caractéristiques de l'étalement définies dans les chapitres précédents (apparition des adhésions, transition de l'étalement, taille après 20 minutes...).

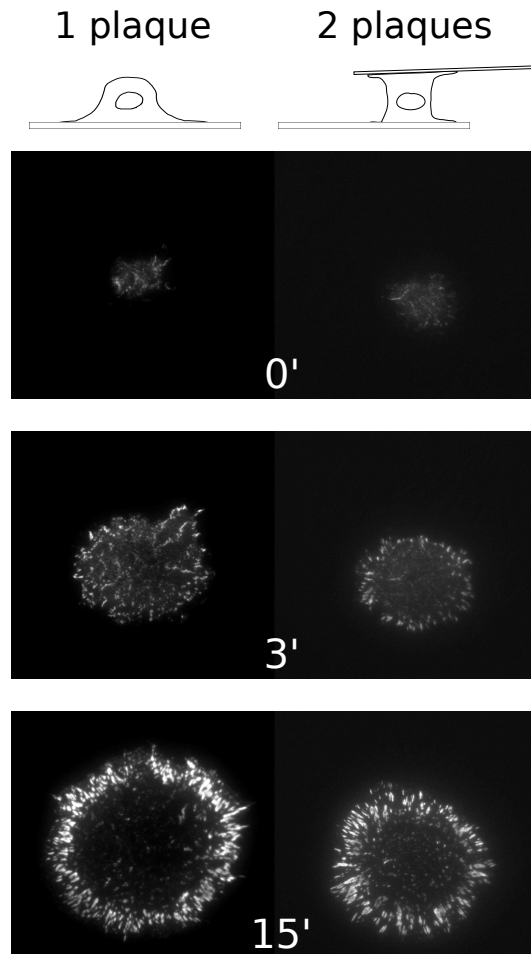


FIGURE 4.1 – Séries d'image en TIRF typiques d'étalements sur une plaque et entre deux plaques. L'échelle est conservée.

4.1.2 Première phase et transition de l'étalement

Commençons par comparer les rayons caractérisant l'apparition des adhésions et la transition entre P1 et P2 pour une plaque et deux plaques. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, ces rayons (de même que les rayons à l'équilibre) varient légèrement selon la raideur dans la géométrie à deux plaques. Cependant, ces variations sont du deuxième ordre comparé à celles induites par la géométrie, nous avons donc moyenné toutes les mesures obtenues à deux plaques indépendamment de la raideur. Les mesures présentées ici résultent donc de moyennes sur $n=23$ cellules pour une plaque et $n=40$ cellules pour deux plaques.

La figure 4.2-A et B représentent respectivement l'aire de contact cellule-substrat juste avant l'apparition des adhésions et juste avant la transition vers la phase 2 de l'étalement pour une et deux plaques. Nous avons représenté ici les données en terme d'aire plutôt qu'en terme de rayon pour mettre en évidence ce qui ressort de ces mesures. En effet, l'aire cellulaire au niveau de ces deux transitions est divisé par deux quand on passe de une à deux plaques. On a ainsi, pour les adhésions : $A_a^*(2\text{plaques}) = 344 \pm 19 \mu\text{m}^2$ et $A_a^*(1\text{plaque}) = 691 \pm 67 \mu\text{m}^2$; de même, pour le changement de régime de l'étalement : $A_s^*(2) = 469 \pm 33 \mu\text{m}^2$ et $A_s^*(1) = 1099 \pm 94 \mu\text{m}^2$.

Mais si on considère que le comportement sur la plaque supérieure est le même que sur la plaque inférieure, c'est-à-dire que l'aire totale de contact plaques-cellule est le double de l'aire de contact mesurée sur la plaque inférieure, alors ces mesures montrent que l'aire de contact à laquelle ont lieu les deux transitions est constante à l'échelle cellulaire. Au passage, si l'on conserve cette hypothèse de symétrie, ces données indiquent aussi que la différence entre aire de transition du rayon et des adhésions ($A_s^* - A_a^*$) est elle aussi conservée puisque les deux termes de cette différence sont modifiés de la même manière par le changement de géométrie.

Rappelons enfin que la vitesse d'étalement pendant la phase P1, gouvernée uniquement par la polymérisation de l'actine dans le lamellipode, est identique pour une et deux plaques (Fig 4.2-C). Les aires de contact cellule-substrat aux différentes transitions étant par ailleurs divisée par deux pour deux plaques, ceci conduit à l'apparition plus précoce de la couronne d'adhésion dans cette géométrie, comme observé sur la figure 4.1.

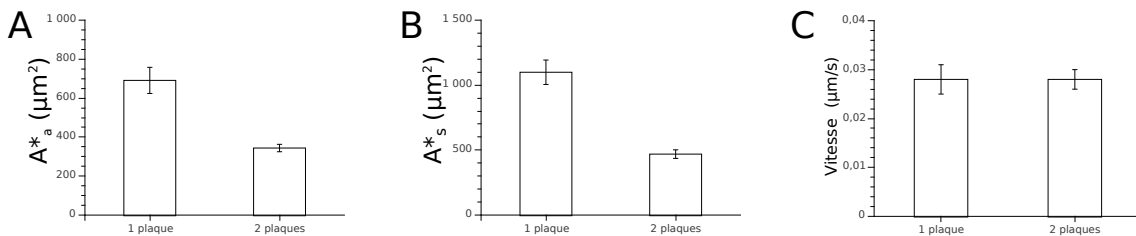


FIGURE 4.2 – Histogrammes de l'aire moyenne des cellules précédant l'apparition des adhésions (A), l'aire moyenne des cellules précédant la transition de l'étalement (B), la vitesse moyenne d'étalement des cellules pendant P1 (dR/dt) (C), en fonction de la géométrie de l'expérience.

4.1.3 Croissance des adhésions et état final

A ce niveau, on peut se demander si d'autres paramètres de l'étalement sont modifiés par la géométrie de la surface adhésive. Nous avons donc quantifié la surface cellulaire sur une plaque et entre deux plaques 20 minutes après le début de l'étalement, lorsque force, étalement et croissance des adhésions ont saturé. Pour deux plaques, nous obtenons : $A_{sat}(2) = 851 \pm 75 \mu m^2$ et sur une plaque : $A_{sat}(1) = 1818 \pm 100 \mu m^2$ (voir histogramme Fig 4.3-A). Nous constatons donc que l'aire de contact totale après 20 minutes est là encore divisée par deux sur la lamelle inférieure lorsqu'une autre plaque est disposée au-dessus de la cellule, montrant là encore une limitation de l'aire de contact totale.

De plus, la portion de l'aire de contact occupée par les adhésions après 20 minutes est la même quelle que soit la géométrie du substrat : $\frac{A_{adh}}{A_c}(2) = 0,11 \pm 0,01$ pour deux plaques et $\frac{A_{adh}}{A_c}(1) = 0,10 \pm 0,01$ pour une plaque (Fig 4.3-B). Ceci signifie que le nombre de paxillines engagées dans les adhésions à l'équilibre est directement proportionnel à l'aire de contact cellule-substrat.

On peut alors se demander si la vitesse à laquelle croissent les adhésions $\frac{dA_{adh}}{dt}$ est modifiée par la géométrie à deux plaques. Les résultats que nous obtenons ne font aucun doute. Nous avons : $\frac{dA_{adh}}{dt}(2) = 0,17 \pm 0,01 \mu m^2.s^{-1}$ et $\frac{dA_{adh}}{dt}(1) = 0,34 \pm 0,03 \mu m^2.s^{-1}$. La pente de l'aire d'adhésion est donc divisée par deux lorsqu'on ajoute une plaque au-dessus de la première. Ce résultat n'est pas étonnant puisque l'aire à laquelle s'opère la transition et l'aire finale d'étalement, d'un côté, et l'aire finale de la couronne d'adhésion, d'un autre côté, sont divisées par deux lorsqu'on ajoute la deuxième plaque. L'aire des adhésions représente donc une fraction constante de l'aire de contact. Lorsque les cellules s'étalent entre deux plaques durant P2, l'aire de contact créée et les adhésions se répartissent entre les deux plaques. ceci conduit à une dérivée temporelle observée sur une plaque dont la valeur est exactement la moitié de celle observée sur substrat plan.

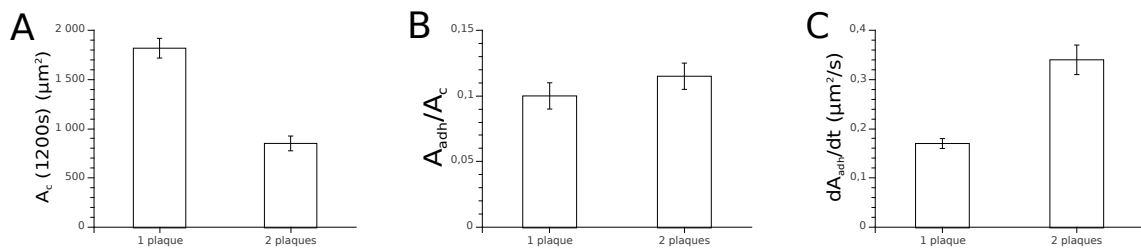


FIGURE 4.3 – Histogrammes de l'aire moyenne des cellules après 20 minutes d'étalement (A), du rapport de l'aire de la couronne d'adhésions sur l'aire de contact cellule-substrat (B), du taux d'accroissement de l'aire d'adhésion (C), en fonction de la géométrie de l'expérience.

4.2 Discussion et perspectives

4.2.1 Discussion

Les résultats précédents nous montrent donc que toutes les aires caractéristiques de l'étalement (apparition des adhésions, transition de l'étalement, saturation,...) sont divisées par deux lorsque la cellule s'étale sur deux plaques parallèles simultanément. Ces résultats sont cohérents avec le schéma de l'étalement avancé jusque-là.

Ils confirment tout d'abord que l'apparition des adhésions est gouvernée par un facteur purement géométrique. Nous avons vu auparavant que ce facteur géométrique correspond à un angle de contact de 90° entre le corps cellulaire et le substrat. Dans ce cadre, nous pouvons intuitivement que l'aire d'apparition des adhésions doit être plus petite lorsque la cellule s'étale entre deux plaques. En effet, pour s'étaler lors de la première phase, la cellule déplace du cytoplasme et du cortex depuis le volume central vers les plaques. Étant donné que la vitesse d'étalement durant P1 est la même dans les deux géométries, ce transport sera deux fois plus important lorsqu'elle s'étale sur deux plaques en parallèle. La figure 4.4 illustre cette idée. On observe sur ce schéma que le corps cellulaire subit une succion plus grande lorsque la cellule est placée entre deux plaques ($\theta_1 > \theta_2$ pendant un même pas de temps dt); il devrait donc atteindre l'angle critique de formation des adhésions (90°) beaucoup plus rapidement que lors de l'étalement simple. Cependant, il faudrait avoir recours à des simulations numériques pour montrer que la transition apparaît précisément pour une aire diminuée de moitié dans le cas à deux plaques.

Au passage, c'est ce mécanisme qui pourrait expliquer le fait que le temps de latence entre augmentation de force et création des adhésions diminue lorsqu'on augmente la raideur effective.



FIGURE 4.4 – Schéma de principe montrant la variation de l'angle de contact pendant un incrément de temps dans les deux géométries testées. La cellule est représentée par un rectangle dans l'état initial.

La transition vers le second régime de l'étalement se produit elle aussi pour une aire de contact globale conservée dans les deux géométries étudiées. Nous retrouvons alors le même dilemme qu'au chapitre 2 où deux hypothèses très différentes pouvaient expliquer la transition. La première hypothèse était que le ralentissement fait suite au changement de forme de la cellule et donc à la projection de la tension corticale sur le front avant de la cellule, qui s'opposerait à la poussée de l'actine. Cette hypothèse peut être maintenue ici puisque nous avons vu que l'apparition des adhésions (qui suit l'apparition de la force, donc la transition de la forme cellulaire) a lieu à une aire deux fois inférieure à deux plaques et précède ainsi le ralentissement de l'étalement.

La deuxième hypothèse était que le ralentissement de l'étalement faisait suite à l'épuisement d'un réservoir de membrane et à l'augmentation brusque de la tension

qui lui serait associée. Alors, dans la géométrie à deux plaques, cet excès se répartirait sur chacune des deux plaques. Certes, à volume constant, la surface du corps cellulaire va changer avec l'étalement ce qui complique le problème, mais on peut supposer que cette diminution sera du deuxième ordre par rapport à la surface membranaire mise en jeu dans l'étalement de la lamelle. Ainsi, la transition sur chacune des deux plaques devrait se produire pour une surface deux fois inférieure à celle observée pour l'étalement simple, indépendamment de la force transmise au substrat et des adhésions.

Ces deux mécanismes imposent une vitesse d'étalement pendant la seconde phase indépendante de la géométrie de l'expérience. Dans le premier cas, cette vitesse sera limitée par la vitesse d'assemblage et de désassemblage des patchs d'adhésion à l'avant de la cellule. Dans le second cas, elle sera limitée par l'exocytose au niveau de la membrane libre. Par conséquent, si l'aire globale de contact à l'entrée dans la seconde phase et la vitesse d'étalement pendant cette phase ne sont pas modifiées par l'ajout de la plaque supérieure, alors l'aire finale d'étalement sur la somme des deux plaques ne doit pas non plus être modifiée ; c'est ce que montrent nos mesures.

En outre, le fait que la couronne d'adhésion occupe environ un dixième de l'aire cellulaire à l'équilibre dans les deux géométries laisse penser que la taille de la couronne d'adhésion est contrôlée par l'étalement de la cellule dans son ensemble. Nous ne pouvons expliquer cette observation pour l'instant. Elle est toutefois corroborée par un autre résultat que nous avons obtenu en analysant les images en microscopie confocale de cellules fixées au cours de l'étalement. La figure 4.5 montre ainsi que l'aire du corps cellulaire au niveau du contact avec le substrat est proportionnelle à l'aire de contact globale cellule-substrat. Il existe donc une relation de proportionnalité entre l'extension du corps cellulaire et la taille de la lamelle, relation qui pourrait être à l'origine de la loi d'échelle entre l'aire de la couronne d'adhésion et l'aire de contact cellule-substrat, si l'on suppose que les adhésions tendent à occuper une portion constante de la lamelle.

D'autre part, ce résultat suggère que le rapport entre les vitesses d'étalement des deux régions (corps cellulaire et cellule entière) est constant tout au long de l'étalement. Ainsi, l'avancée du corps cellulaire pourrait être causée par une traction du compartiment lamellaire tirant à l'avant de la cellule.

4.2.2 Perspectives

Une possibilité qui permettrait d'aller plus loin dans ces questionnements serait d'observer l'étalement d'une cellule après qu'elle se soit étalée sur la lamelle supérieure puis détachée de cette lamelle. Nous avons en effet observé à plusieurs reprises des cellules se détachant après avoir effectué leur traction. L'étalement de ces cellules est alors relancé et l'aire finale après le second étalement est environ le double de l'aire à laquelle avait saturé la cellule entre deux plaques (voir un exemple Fig 4.6). Nous pourrions donc tenter de provoquer ce genre de phénomènes, par exemple en tirant sur la lamelle souple à la fin d'une expérience de traction, et éventuellement vérifier si notre observation se répète.

Une autre idée nous a été suggérée par Alexander Bershadsky afin d'étudier le rôle de la géométrie dans nos expériences. Il s'agit de droguer les cellules avec la mitomycine

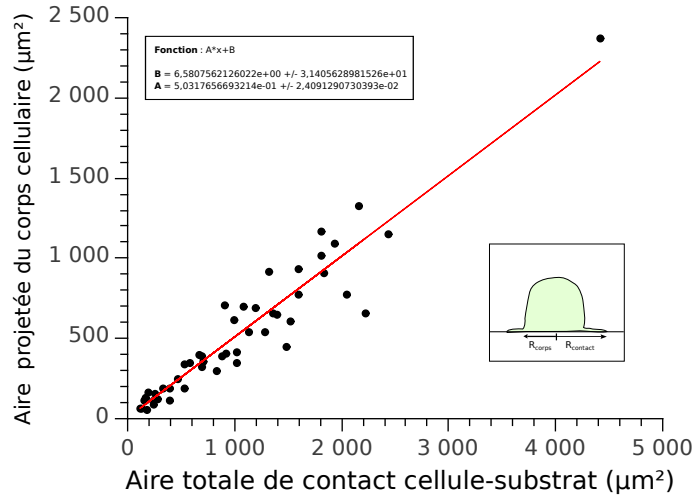


FIGURE 4.5 – Graphe montrant l’aire du corps cellulaire au niveau du contact avec le substrat en fonction de l’aire de contact globale de la cellule, pour chaque cellule fixée et imagée au microscope confocale.

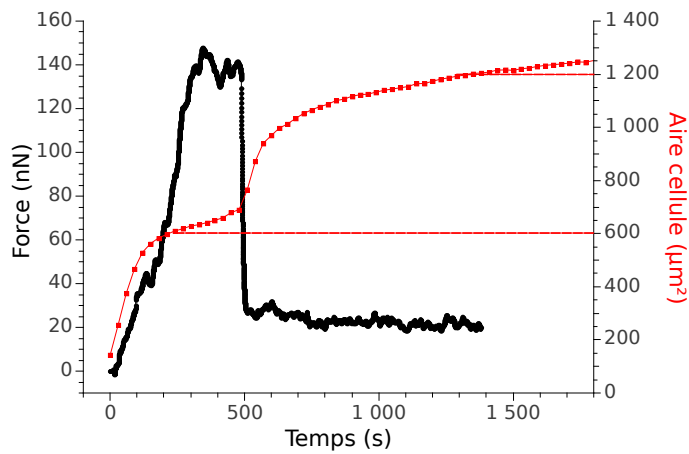


FIGURE 4.6 – Force et aire de contact cellule-substrat au cours d’une expérience où la cellule se détache de la lamelle supérieure.

C, un inhibiteur de la mitose, dans le but de fabriquer des cellules de grand volume. Ainsi, en cultivant les cellules en présence de $0,5 \mu M$ de mitomycine pendant le temps moyen d'une division (24h), nous sommes parvenus à obtenir des cellules viables de volume moyen deux fois supérieur à celui des cellules contrôles.

Célian Bimbard a réalisé des expériences d'étalement simple sur des cellules traitées avec cette drogue. Il a ainsi pu montrer que le rayon R_a^* où apparaissent les adhésions augmente avec le volume cellulaire, ce qui est cohérent avec notre interprétation géométrique du phénomène. Cependant, les mesures sont trop bruitées pour pouvoir identifier l'équation qui relie ce rayon au volume initial de la cellule.

Un autre résultat intéressant qui émerge de ces expériences est le rapport conservé entre aire de la couronne d'adhésion et aire cellulaire à l'équilibre. En effet, ici aussi les adhésions occupent environ un dixième de l'aire cellulaire. Ceci étend donc les résultats que nous avons obtenu sur les cellules contrôles en étalement simple et entre deux plaques. Pour comprendre ces résultats, la piste du rapport conservé entre aire projetée du corps cellulaire et aire de la lamelle sera à poursuivre.

Enfin, pour continuer dans cette direction, l'étape suivante consistera à utiliser ces cellules pour des expériences entre deux plaques, où l'on pourra mesurer les données caractéristiques de l'étalement, mais surtout voir comment la force de traction varie avec la taille des cellules.

Toutefois, les résultats expérimentaux obtenus dans ce chapitre et le précédent sont déjà très nombreux et clairs. Le prochain travail qui devrait faciliter leur interprétation sera donc de modéliser nos expériences à partir d'outils théoriques ou bien de simulations numériques.

4.3 Résumé des résultats obtenus dans les chapitres 2,3 et 4

Voici maintenant le schéma global de l'étalement que l'on peut déduire des résultats présentés au cours des trois derniers chapitres. Ce schéma se déroule en deux phases aux caractéristiques bien distinctes.

Au cours de la première phase, le contact cellule-substrat grandit rapidement via l'avancée d'un compartiment lamellaire qui s'extraie du corps cellulaire. La vitesse de cet étalement dépend de la polymérisation de l'actine, mais ne dépend pas de la myosine II, ni du traitement de surface du substrat. Ceci est cohérent avec le fait que nous n'avons observé ni force de traction, ni complexes d'adhésion matures pendant cette phase. De plus, comme le suggère la comparaison de l'étalement sur une et deux plaques, cette vitesse caractéristique semble indépendante de la géométrie de l'environnement adhésif : un front d'actine devrait ainsi s'extraire de la cellule sur toute surface plane qui lui est présentée.

La transition vers la seconde phase de l'étalement intervient lorsque le corps cellulaire fait un angle de mouillage de 90° avec le substrat.

Cette transition est de plusieurs ordres. C'est d'abord une transition mécanique puisqu'à partir de cette géométrie particulière, la cellule commence à déformer activement le substrat. Mais c'est aussi une transition chimique puisqu'on voit alors apparaître des patchs d'adhésion denses et allongés, synonymes d'un fort recrutement de protéines adaptatrices. Par conséquent, on peut penser que les voies de signalisation partant des sites d'adhésion sont elles aussi activées à partir de cet instant. Cette transition chimique n'est pas déclenchée par un seuil de force, comme nous l'avons montré en employant des lamelles de raideurs différentes. Cependant, les premières adhésions matures succèdent toujours à l'arrivée de la force, avec un retard qui est d'autant plus grand que la raideur de la plaque est faible.

Enfin, cette transition concerne l'étalement, qui avait lieu à vitesse constante jusqu'à présent, et qui passe dans un régime ralenti. Nous ne savons pas si ce ralentissement est lié à la transition mécanique, qui se produit très souvent un peu avant, ou à l'épuisement d'un réservoir de membrane. Les deux hypothèses sont recevables : dans le premier cas, on peut imaginer que la projection de la tension corticale sur l'avant de la cellule induit une force opposée à la poussée de l'actine ; dans l'autre, on peut penser que la tension de membrane va augmenter subitement ; l'augmentation de l'aire cellulaire sera alors limitée par d'autres processus biologiques comme l'exocytose [Gauthier *et al.*, 2011].

En tout cas, durant la deuxième phase, l'étalement est plus lent, il est indépendant de la myosine mais dépend du traitement de surface du substrat. Ainsi, plus l'affinité du substrat avec l'intégrine est grande, plus l'étalement est important. Ceci laisse penser que la cellule a besoin de former des patchs d'adhésion fermes pour continuer de s'étaler pendant cette phase sans glisser sur le substrat.

Parallèlement à cet étalement, la force de traction et l'aire des adhésions augmentent proportionnellement au temps. Le taux de formation des adhésions est indépendant de la raideur des plaques, tandis que celle de la force est d'autant plus grande que cette raideur est grande. Ceci implique que la taille de la couronne d'adhésion ne dépend pas de la force dans le sens orthogonal aux plaques, bien qu'elle dépende du nombre de myosines II actives. Un paradoxe intervient alors si l'on se souvient du fait que la force dépend de la concentration en myosine II [Mitrossilis *et al.*, 2009]. Pour résoudre ce paradoxe, on doit envisager une compartimentation du système contractile et du

système adhésif, le premier étant sensible à la raideur à l'échelle globale c'est-à-dire à la raideur effective entre les deux plaques, le deuxième étant sensible à la rigidité locale du substrat sur lequel la cellule s'étale ; dans notre cas, il s'agit toujours de verre.

Après sa période de croissance, la surface de la couronne d'adhésions arrive à saturation, légèrement avant la force. La taille de cette couronne représente alors un dixième de l'aire de contact cellule-substrat quelle que soit la répartition de cette aire (sur une ou deux plaques). En effet, nous avons aussi vu que l'aire globale de contact est régulée : elle est la même que la cellule s'étale sur une ou deux plaques, ce qui suggère une limitation de la quantité de surface disponible pour l'étalement.

Conclusion

Nous savons aujourd'hui que l'état dans lequel se trouve une cellule animale à un instant donné de sa vie est réglé par son histoire (cellule-mère), son environnement chimique mais aussi son environnement mécanique. Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons identifié trois paramètres mécaniques qui peuvent ainsi influencer le devenir des cellules : le confinement géométrique, la rigidité de l'environnement, et les contraintes externes (étirement, compression,...). Les études à ce sujet sont récentes, un nouveau champ de recherches s'est ainsi ouvert dont les applications pourraient prendre effet dans des domaines très vastes allant des thérapies basées sur les cellules souches à l'ergonomie des situations de travail. Mais avant cela, il faudra, d'une part, comprendre comment les facteurs mécaniques et chimiques interfèrent pour définir le destin des cellules, d'autre part identifier les mécanismes permettant aux cellules de s'adapter à leur environnement mécanique ; notre thèse s'est inscrite dans cette dernière démarche.

De plus en plus d'études soupçonnent les éléments de l'architecture cellulaire comme étant à la source des phénomènes de mécano-sensibilité cellulaire ; d'abord parce qu'ils sont eux-mêmes fortement adaptés à l'environnement mécanique, ensuite parce qu'en tant que structures mécaniques ils sont des relais naturels à la transmission de l'information mécanique. Ces éléments sont principalement le cytosquelette (les filaments d'acto-myosine, en particulier) et les complexes d'adhésion.

En étudiant l'étalement de myoblastes entre deux micro-plaques de verre, Démsthène Mitrossilis, dans sa thèse aux côtés d'Atef Asnacios, avait montré que la force de traction générée lors de ce processus s'adapte instantanément à la raideur des micro-plaques, et que cette adaptation pouvait être liée à une réponse directe du cytosquelette d'acto-myosine. Pour compléter ce travail, nous avons souhaité construire un dispositif similaire à celui qu'il avait utilisé, qui permettrait, en plus des données sur la contractilité du cytosquelette, de recueillir des informations sur le comportement des complexes d'adhésion pendant ce phénomène, à l'aide de la microscopie TIRF.

Ce dispositif est actuellement en fonctionnement, et nous donne donc accès à la dynamique et l'interaction des deux éléments prépondérants pour la mécano-sensibilité cellulaire. De plus, il permet d'intervenir sur les trois paramètres mécaniques importants pour les cellules. En effet, comme dans le rhéomètre à cellule unique, la raideur des lamelles peut y être ajustée (y compris en temps réel grâce à un système de rétroaction), mais il est également possible d'appliquer des forces uniaxiales d'étirement ou de compression ; enfin, l'effet du confinement géométrique peut être investigué en comparant l'étalement sur une plaque et entre deux plaques.

Mais, afin d'analyser correctement les données issues de ce dispositif, nous avons aussi dû, au cours de cette thèse, résoudre un problème délicat de traitement d'images. Il s'agissait en effet de détecter la présence d'objets très mal définis, les patches d'adhé-

sion, et possiblement modifiés par la prise d'images elle-même. Après de nombreux détours, nous avons réussi à mettre au point une méthode objective de détection, qui n'est pas exactement transposable dans tous les systèmes expérimentaux mais dont beaucoup pourraient s'inspirer afin de parvenir à une normalisation des définitions dans ce domaine.

Au départ de ce travail, nous cherchions à connaître quelle relation entretenaient la force de traction et les complexes d'adhésion, et éventuellement l'effet de la raideur sur cette relation pendant l'étalement. Mais nos expériences, que l'on pensait préliminaires, sur la dynamique des adhésions pendant l'étalement sur substrat plan, nous ont conduit à mettre en lumière l'importance de la forme globale de la cellule pour le développement des adhésions (chapitre 2). Nous avons ainsi remarqué que l'étalement de nature purement physique gouverné par la polymérisation de l'actine conduit à un changement d'inclinaison du corps cellulaire au cours duquel la tension corticale est projetée sur la lamelle et le lamellipode. Les adhésions ne peuvent alors mûrir que lorsque ce changement de forme a eu lieu.

Ce lien *Forme* \rightarrow *Adhésion* a ensuite pu être complété par les mesures de forces de traction qui nous ont montré, d'une part, que l'apparition de la force est effectivement synchronisée avec la projection de la tension corticale sur la lamelle, d'autre part que la maturation des adhésions n'intervient qu'après que la force ait commencé à croître (chapitre 3). Nous sommes donc parvenus à la relation *Forme* \rightarrow *Force* \rightarrow *Adhésion*. Or, plusieurs études avant nous avaient souligné l'intrication entre force et adhésion sans savoir lequel de ces deux paramètres était subordonné à l'autre. Nous ajoutons ici un troisième paramètre clé ; il s'agit du rôle de la forme et de la projection de la tension corticale sur la lamelle, qui semblent piloter la force transmise au substrat et donc la formation des adhésions.

Enfin, nous avons vu que dans la deuxième partie de l'étalement, les cellules ne peuvent continuer de s'étendre sans former d'adhésions, la polymérisation de l'actine ne pouvant contrecarrer à elle seule la tension du cortex. Par conséquent, si, à l'origine, un changement de forme est nécessaire à la création des adhésions, c'est ici la capacité à créer des adhésions qui est nécessaire à l'évolution de la forme. Ceci nous conduit à ajouter une nouvelle étape *Adhésion* \rightarrow *Forme* à notre scénario. En bilan, la morphogénèse cellulaire lors de l'étalement précoce des cellules animales semble donc gouvernée par la boucle : *Forme* \rightarrow *Force* \rightarrow *Adhésion* \rightarrow *Forme*.

Les résultats du chapitre 4 découlent de ce lien entre forme et adhésion que nous avons mis en évidence. En effet, il n'est pas étonnant, à partir de là, qu'une modification de l'environnement adhésif par l'ajout d'une seconde plaque ne vienne modifier la distribution des complexes adhésifs et l'aire de contact cellule-substrat. Cependant, les résultats obtenus laissent apparaître une relation exagérément simple : toutes les aires caractéristiques de l'étalement sont divisées par deux par l'ajout de la deuxième plaque ; ces données devraient donc contraindre fortement un éventuel modèle théorique de l'étalement qui viendrait compléter notre travail.

Quant aux résultats obtenus au chapitre 3 concernant l'effet de la raideur sur la force et les complexes d'adhésion, ils se prêtent moins facilement à l'interprétation. En effet, nous avons vu que l'apparition de la couronne adhésive est fonction de la raideur (le temps et la force typiques d'apparition sont fonction de ce paramètre). Toutefois,

alors que la force maximale et l'accroissement de force sont tous deux adaptés à la raideur de la lamelle souple, la croissance et la taille de la couronne ne dépendent pas de ce paramètre. Ces données semblent remettre en cause l'idée selon laquelle l'aire des adhésions serait directement proportionnelle à la force qu'elles supportent. Elles nous ont amenés à envisager le fait que la cellule s'adapte à la rigidité de son environnement au travers de deux compartiments séparés. Ainsi, la force de traction normale appliquée entre les plaques parallèles s'adapterait à l'échelle globale au travers d'une réaction du cortex d'acto-myosine à la rigidité, et les adhésions adapteraient leur taille à la rigidité locale de leur environnement (dans notre cas le substrat de verre entre les points d'adhésion) grâce à des protéines mécano-sensibles.

Afin de vérifier cette hypothèse, il sera intéressant d'étudier l'étalement de nos cellules en recouvrant la lamelle inférieure d'un gel mou déformable par les cellules. Ce type d'expériences devraient nous permettre de savoir si c'est la rigidité à l'échelle locale (et non celle ressentie par toute la cellule) qui gouverne la taille des adhésions.

Mais de nombreuses autres pistes restent à explorer dans la continuité de ce travail. Nous avons cité au fur et à mesure des chapitres les travaux directement imaginables qui complèteraient les mesures réalisées ; nous pouvons donc maintenant nous intéresser aux perspectives à plus long terme.

Une première direction concernerait l'étude de l'étalement entre deux plaques en vidéo-microscopie confocale. En associant à la myosine II un marqueur fluorescent, nous pourrions ainsi corréler les variations respectives de la forme de la cellule et de la couronne d'adhésion avec l'organisation du cortex d'acto-myosine. De cette manière, nous pourrions savoir par exemple si l'épaisseur du cortex change au cours de l'étalement, si des structures semblables à des fibres de stress apparaissent pendant ce processus ou encore quel paramètre (raideur ou force) est essentiel pour l'auto-organisation des filaments d'acto-myosine.

Par ailleurs, durant cette thèse, nous nous sommes très peu intéressés au comportement de la membrane plasmique, qui est pourtant un acteur dont nous avons souligné l'importance pour la morphogénèse cellulaire et la mécano-sensibilité. De nombreuses techniques permettent aujourd'hui de connaître l'état de la membrane en temps réel et ce serait probablement le travail d'une thèse entière que de les adapter dans le but d'étudier le phénomène modèle auquel nous nous intéressons.

Une autre piste que nous pourrions explorer concerne l'événement suivant l'étalement précoce, à savoir la polarisation des fibroblastes. En effet, après être passés de rondes à étalées, ces cellules subissent dans la foulée un second événement morphogénétique en s'allongeant spontanément dans une direction privilégiée. Ce phénomène est couplé à un alignement des adhésions focales et des fibres d'acto-myosine dans la même direction. Il s'agirait donc dans un premier temps de faire le travail que nous avons fait pour l'étalement précoce en enregistrant la dynamique des adhésions focales et en corrélant les éventuels événements marquants avec la forme globale prise par la cellule.

Pour finir, deux thèses sont actuellement en cours au laboratoire qui exploiteront les outils expérimentaux et conceptuels présentés ici sur des systèmes biologiques différents. La thèse de Nathalie Bui porte ainsi sur l'influence de la mécanique sur la synapse immunitaire ; quant à celle de Pauline Durand, elle traite de la mécano-transduction chez des cellules de plantes isolées. Dans les deux cas, le dispositif couplant mesure de

force et rigidité variable avec la microscopie TIRF devrait permettre de mettre en évidence comment l'organisation des récepteurs de signalisation dans un cas, ou celle des éléments du cytosquelette dans l'autre, est modifiée par les signaux mécaniques.

Tableau récapitulatif des paramètres caractéristiques de l'étalement

Conditions	$v_{P1}(\mu m/s)$	$R_a^*(\mu m)$	$t_a^*(s)$	$R_s^*(\mu m)$	$t_s^*(s)$	$\frac{dA_{adh}}{dt}(\mu m^2/s)$	$R_{sat}(\mu m)$	$\frac{A_{adh}(sat)}{\pi R_{sat}^2}$
Controle - 1 plaque (n=23)	$0,028 \pm 0,002$	$15,5 \pm 0,7$	380 ± 40	$18,3 \pm 0,8$	450 ± 60	$0,34 \pm 0,03$	$23,8 \pm 0,7$	$0,10 \pm 0,01$
Y-27632 (n=16)	$0,027 \pm 0,004$	$16,6 \pm 0,5$	380 ± 40	$19,7 \pm 1,0$	530 ± 60	$0,15 \pm 0,02$	$23,8 \pm 0,6$	$0,022 \pm 0,003$
Polylysine (n=16)	$0,029 \pm 0,004$	$18,6 \pm 1,1$	850 ± 130	$15,8 \pm 1,0$	490 ± 130		$19,9 \pm 1,0$	$0,030 \pm 0,004$
Faible fibronectine (n=10)	$0,028 \pm 0,003$	$15,2 \pm 1,2$	520 ± 130	$14,5 \pm 1,1$	380 ± 80	$0,27 \pm 0,02$	$20,7 \pm 0,9$	$0,10 \pm 0,02$
Latrunculine-A (n=16)	$0,016 \pm 0,003$	$14,7 \pm 1,2$	430 ± 70	$21,7 \pm 2,3$	870 ± 160		$25,6 \pm 1,6$	$0,08 \pm 0,01$
k =1,5 (n=12)	$0,023 \pm 0,004$	$10,8 \pm 0,5$	280 ± 90	$13,2 \pm 0,7$	540 ± 140	$0,18 \pm 0,02$	$17,8 \pm 1,2$	$0,10 \pm 0,01$
k =12,5 (n=15)	$0,030 \pm 0,005$	$10,8 \pm 0,5$	250 ± 60	$11,4 \pm 0,8$	250 ± 70	$0,17 \pm 0,02$	$16,6 \pm 1,1$	$0,12 \pm 0,02$
k = ∞ (n=13)	$0,031 \pm 0,005$	$9,1 \pm 0,3$	160 ± 50	$10,8 \pm 0,7$	230 ± 50	$0,15 \pm 0,01$	$13,2 \pm 1,3$	$0,12 \pm 0,02$
Moyenne 2 plaques (n=40)	$0,028 \pm 0,003$	$10,3 \pm 0,3$	230 ± 40	$11,9 \pm 0,4$	360 ± 60	$0,17 \pm 0,01$	$15,8 \pm 0,7$	$0,11 \pm 0,01$

ANNEXE A

Traitement d'image et analyse

Traitement d'image pour la mesure de l'aire cellulaire

Nous utilisons le logiciel *ImageJ* pour quantifier l'aire de contact cellule-substrat. La méthode employée a l'avantage d'être très robuste ; son inconvénient est qu'elle n'est pas très précise si l'on s'intéresse au détail des contours de la cellule. Néanmoins cette méthode est largement suffisante pour quantifier les changements de forme globaux que subit la cellule pendant l'étalement.

Voici la manière dont elle fonctionne. Nous appliquons d'abord à la pile d'image un filtre *Despeckle* pour retirer les points chauds de l'image, puis un filtre *Smooth* pour lisser l'image. Le fond de l'image est ensuite retiré grâce à la fonction *Subtract Background*. La cellule apparaît alors brillante sur un fond noir, il suffit donc à l'utilisateur de choisir un seuil très bas rendu évident par le traitement précédent pour laisser apparaître l'essentiel du contour cellulaire binarisé. Pour finir, nous appliquons la fonction *Close* afin de connecter les éventuels morceaux de la cellule qui ne seraient pas reliés au reste de la forme, puis la fonction *Fill Holes* qui permet de boucher les trous présents à l'intérieur du contour. L'aire cellulaire correspond à l'aire de la forme ainsi déterminée.

Algorithme de détermination de la transition entre phases d'étalement

La méthode utilisée pour la détermination de la transition entre P1 et P2 est la suivante. D'abord, nous ajustons la courbe de rayon en fonction du temps $R(t)$ sur une partie de l'intervalle de temps $[0, \tau]$ par une droite $r(t)_{[0,\tau]} = at + b$. Nous faisons ce travail pour chaque valeur de τ allant de 0 à T, où T est le temps total de l'expérience. Puis nous traçons le coefficient de détermination $R^2(\tau)$ défini comme :

$$R^2(\tau) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{\tau} (R_i - r_i)^2}{\sum_{i=1}^{\tau} (R_i - \bar{R})^2} \quad (\text{A.1})$$

Ainsi, plus R^2 se rapproche de 1, plus l'ensemble de points considéré se rapproche de la droite par laquelle on l'a ajusté et plus il s'éloigne d'un nuage de point centré sur la moyenne des valeurs de R sur l'intervalle en question. Comme le montre la figure A.1-A, R^2 est proche de 1 pour les petits τ (i.e avant la transition), puis il diminue brusquement au moment où le rayon ralentit. Le temps de transition t_s^* est défini comme le temps τ correspondant au maximum de $R^2(\tau)$ le plus proche de T. Le rayon de transition est

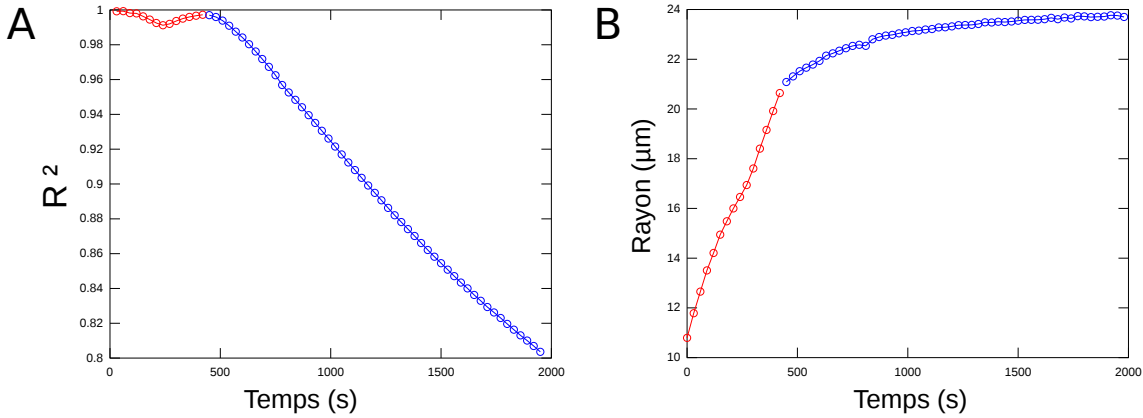


FIGURE A.1 – A- Graphe montrant l'évolution de $R^2(\tau)$ en fonction du temps. B- Graphe montrant, pour la même cellule, la transition entre les deux phases de l'étalement correspondant au maximum de la courbe de la figure A.

donc défini comme $R_s^* = R(t_s^*)$ (Figure A.1-B) et la vitesse d'étalement dans le premier régime (dR/dt) comme la pente de la droite $r(t)_{[0,t_s^*]}$.

Méthodes de délimitation des patches d'adhésion

Les patches d'adhésion sont des endroits de la zone de contact cellule-substrat contenant une forte densité de paxilline. Afin d'isoler ces patches du reste de l'image, nous avons dû définir un seuil d'intensité ; les pixels dont l'intensité est supérieure à ce seuil sont considérés comme faisant partie des patches d'adhésion, les autres non. Pour déterminer ce seuil, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires : une méthode manuelle et une méthode automatique.

Notons au passage que les images subissent un très léger traitement avant cette opération. Pour les lisser, nous appliquons un filtre *Despeckle* suivi d'un filtre *Smooth*.

Méthode manuelle

Dans la méthode manuelle, le seuil est défini à la main au moment de l'apparition d'une couronne intense entourant la cellule. Le seuil choisi doit alors englober cette couronne. Ce seuil est ensuite maintenu constant pour toutes les images.

Afin de vérifier la robustesse de cette méthode, nous avons demandé à 6 personnes différentes du laboratoire de déterminer ce seuil pour une expérience typique en suivant la définition précédente. Nous avons ensuite tracé les courbes d'intensité totale dans les adhésions en fonction du temps pour chacune de ces personnes. Toutes les courbes sont très semblables. L'erreur relative standard sur l'intensité maximale est de 12%, l'erreur relative standard sur le temps correspondant à l'apparition des adhésions (t_a^*) de 20%. Ces chiffres sont très corrects et laissent penser que le critère choisi traduit bien un phénomène significatif de l'étalement cellulaire.

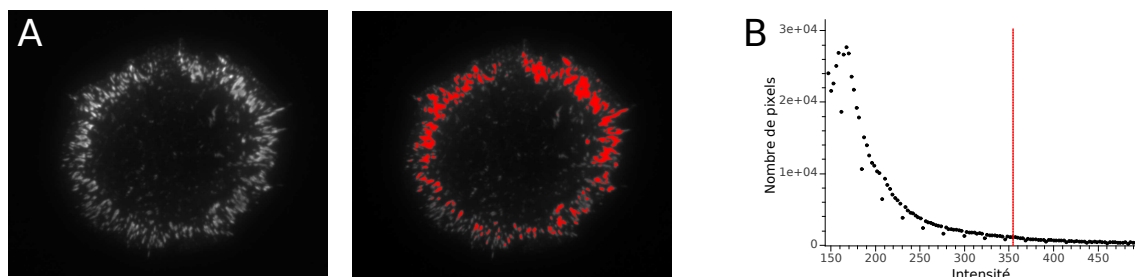


FIGURE A.2 – A- En rouge, à droite, zone d’adhésion détectée par l’algorithme de détection automatique à partir de l’image de gauche. B- Histogramme des intensités de l’image montrant le seuil d’intensité déterminé par l’algorithme. (Les points sous la courbe principale sont dus à une erreur de découpage de *ImageJ*.)

Méthode automatique

Notre méthode automatique utilise un algorithme d’auto-seuillage appelé *RenyiEntropy* implémenté dans *ImageJ* et dont le principe a été décrit par [Kapur *et al.*, 1985]. Nous avons choisi cet algorithme d’auto-seuillage car les résultats qu’il fournit se rapprochent fortement de ceux que l’on obtient à l’œil.

Le principe de cet algorithme repose sur le calcul de l’entropie¹ de l’histogramme des intensités (représentant le nombre de pixels de chaque intensité en fonction de cette intensité) que l’on divise en deux sous-intervalles. L’entropie S est calculée indépendamment sur les intervalles $[0, i]$ et $[i, I]$ où I est l’intensité maximale présente dans l’histogramme. Le seuil d’intensité choisi correspond alors à l’intensité i^* qui maximise la somme des entropies $S_{tot} = S[0, i] + S[i, I]$ de ces deux intervalles. Ce seuil est recalculé à chaque image de la pile.

La figure A.2 présente le travail de détection réalisé sur une image typique.

Comparaison des deux méthodes

Comme le montre la figure A.3, les deux méthodes que nous venons de présenter fournissent des résultats très semblables, ce qui montre bien que les objets que nous discernions à l’œil et par la méthode manuelle apparaissent clairement dans l’histogramme des intensités analysé avec la méthode automatique.

Ces deux méthodes sont complémentaires et possèdent chacune des avantages qui leurs sont propres. La méthode automatique a le grand avantage d’être complètement objective. De plus, si l’intensité moyenne des patches varie au cours d’une expérience (par exemple à cause du photo-blanchiment), la détection ne sera pas affectée puisque le seuil est calculé pour chaque image. En revanche, l’automatisme de la méthode rend la détection plus bruitée, l’algorithme étant notamment sensible aux défocalisations.

La méthode manuelle fournit quant à elle des courbes plus lisses. Cependant, les résultats obtenus par cette méthode peuvent légèrement dépendre de l’utilisateur et de la manière dont il considère l’apparition de la couronne. Par ailleurs, on observe souvent que la courbe de l’aire d’adhésion en fonction du temps décroît à la fin des

1. Attention, l’entropie est ici une mesure de l’information au sens de Shannon. Elle est définie comme l’opposé de cette information et n’a (presque) rien à voir avec l’entropie que l’on emploie en thermodynamique.

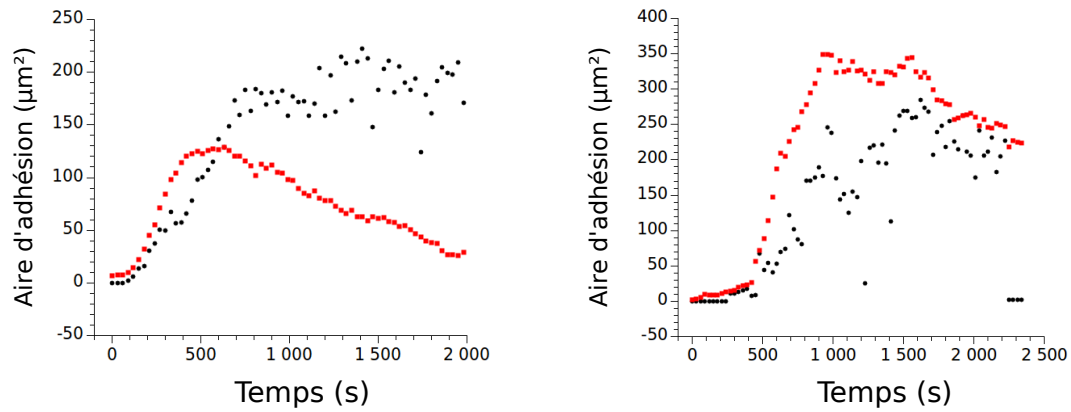


FIGURE A.3 – Deux exemples montrant l'évolution de l'aire d'adhésion calculée avec la méthode manuelle (en rouge) et la méthode automatique (en noir). Le cas de gauche, où la courbe rouge décroît rapidement après avoir atteint son maximum, est le plus fréquent.

expériences (Fig A.3), ce qui est beaucoup plus rare avec la méthode automatique. Ceci laisse penser que les adhésions n'ont pas toujours la même intensité moyenne au cours d'une expérience ; le seuil devrait donc être réajusté à chaque image, ce qui prendrait trop de temps avec la méthode manuelle.

ANNEXE B

Photo-blanchiment et phototoxicité

Les expériences en dynamique sur des cellules vivantes dotées de marqueurs fluorescents sont toujours délicates en raison du photo-blanchiment et de la photo-toxicité, deux artefacts provenant de l'impact nocif du laser sur les fluorophores.

Photo-blanchiment

On appelle photo-blanchiment l'extinction des fluorophores suite à une trop forte sollicitation par la lumière laser. La maîtrise de ce phénomène est particulièrement critique pour nous puisque nous cherchons à mesurer la dynamique d'objets apparaissant et disparaissant au cours d'une même expérience. En particulier, il apparaissait dans nos expériences que certains agrégats de paxilline présents au début de l'étalement avaient disparu à la fin ; de même, le centre de la cellule apparaissait plus sombre à la fin qu'au début.

Nous nous sommes donc demandés si ce comportement était réellement dû à la désagrégation des patches de paxilline ou bien seulement à du photo-blanchiment. Afin de répondre à cette question, nous avons comparé la distribution de la paxilline sur des cellules imagées en dynamique (une image en TIRF chaque 45 secondes) avec celle de cellules qui n'ont subi aucune illumination. Nous avons mesuré ces distributions 20 minutes après le début de l'étalement, temps après lequel la couronne de paxilline est clairement définie. Le tableau-ci dessous résume les résultats obtenus. (A titre informatif, nous avons ajouté la mesure de l'intensité pour des cellules étalées sur des motifs adhésifs de surface réduite.)

	Début de l'étalement		20 min - Région centrale		20 min - Couronne	
	$R_{tot}(\mu m)$	$\langle I \rangle$	$R_c(\mu m)$	$\langle I_c \rangle$	$R_{tot}(\mu m)$	$\langle I_{adh} \rangle$
Sans éclairage			13.3 ± 0.7	172 ± 4	24.9 ± 0.9	302 ± 12
Avec éclairage	$7, 3 \pm 0, 5$	184 ± 5	13.5 ± 0.3	162 ± 3	22.6 ± 0.6	302 ± 14
Petit motif			9 ou 12	177 ± 5		

TABLE B.1 – Tableau récapitulatif des intensités moyennes dans les différentes zones des cellules, avec ou sans l'effet de l'éclairement du laser.

Voici ce que l'on peut conclure de ces chiffres :

- En comparant les intensités moyennes dans la couronne avec ou sans éclairage ainsi que les tailles moyennes des différentes zones, on observe que la couronne de

paxilline (taille et intensité) n'est pas affectée par l'emploi du laser sur la cellule à la fréquence de une image chaque 45 secondes.

- En comparant l'intensité moyenne dans la cellule au début de l'étalement (avec éclairage) avec l'intensité moyenne dans la zone centrale après 20 minutes (sans éclairage), on peut conclure que la décroissance de l'intensité dans cette zone n'est pas due à un artefact. Ceci signifie que les patchs peu intenses qui se forment au début de l'étalement se désintègrent rapidement. Il est aussi possible que la paxilline présente dans cette zone soit ensuite recrutée pour participer à la formation de la couronne d'adhésions.
- Le photo-blanchiment amplifie toutefois ce phénomène comme l'indiquent les valeurs d'intensité dans la zone centrale avec et sans éclairage.
- Malgré une légère décroissance, on n'observe pas de différence significative entre l'intensité dans la zone centrale au début de l'étalement (avec éclairage) et après 20 minutes sur petits motifs (sans éclairage). Cependant, la différence entre intensité dans la zone centrale après 20 minutes avec ou sans motifs (sans éclairage) n'est pas non plus significative. On ne peut donc pas conclure quoi que ce soit sur un possible dépeuplement de la zone centrale dû à l'étalement.

Photo-toxicité

Les fluorophores comme la *Yellow Fluorescent Protein* que nous utilisons ici sont connus pour relarguer des radicaux libres dans leur milieu lorsqu'ils sont exposés à la lumière. Ces radicaux sont toxiques pour nombre de fonctions cellulaires et peuvent même conduire à la mort de la cellule.

Au cours de nos expériences, nous avons noté que l'étalement des cellules est affecté par la fréquence à laquelle elles sont éclairées. La figure B.1 montre l'évolution du rayon des cellules après 20 minutes d'étalement en fonction de la période d'acquisition des images. On observe donc sur cette courbe que plus la cellule est exposée au laser, moins elle s'étale. Ce phénomène est même important puisqu'une exposition au laser toutes les 5 secondes conduit à une aire deux fois moins grande que sans éclairage. Par conséquent, nous avons travaillé à une fréquence (une image chaque 45 secondes) nous permettant de capturer la dynamique de l'étalement sans trop affecter le phénomène, couronne d'adhésion y compris.

Un peu plus tard dans la thèse, nous avons aussi réalisé que la puissance de l'éclairage joue aussi un rôle dans ces phénomènes de photo-toxicité et photo-blanchiment. Ainsi, à nombre de photons émis égal, il est préférable que l'émission ait lieu sur une plus longue durée (long temps d'exposition) et en moins grande quantité par unité de temps (puissance plus faible). Nous avons donc réduit la puissance de notre laser et augmenté le temps d'exposition de façon à maintenir l'éclairement inchangé. Ceci nous a permis d'augmenter la fréquence d'acquisition jusqu'à une image toutes les 30 secondes. L'effet de ce changement est observable sur la figure B.1.

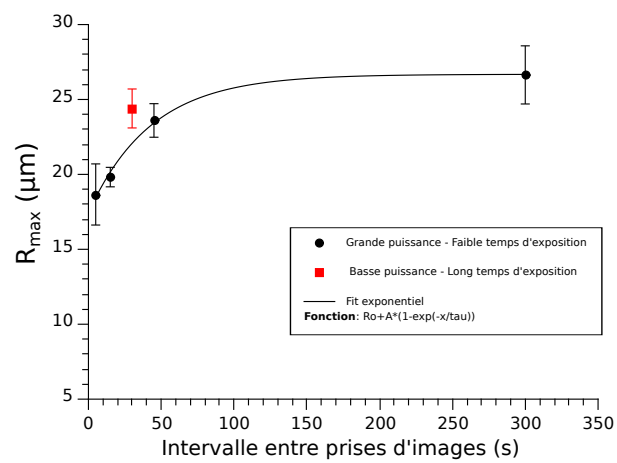


FIGURE B.1 – Graphe montrant le rayon cellulaire après 20 minutes d'étalement en fonction de l'intervalle de temps entre les prises d'images.

ANNEXE C

Fabrication des motifs adhésifs

Le protocole utilisé pour la fabrication des motifs adhésifs a été développée au laboratoire par Olivier de Freitas sous la direction de François Gallet. Pour cela, ils se sont inspirés du protocole mis au point par [Guillou *et al.* , 2008].

Pour commencer, les lamelles de verre servant de substrat sont plongées pendant trois heures dans une solution de silane (96.6% de méthanol, 0.9% d'acide acétique et 2.5% de mercapto-propyltriméthoxysilane). Elles sont ensuite enduites d'une résine sensible aux UV (S1805, Microchemicals) à l'aide d'un dispositif de spin-coating puis chauffées selon le protocole du fournisseur afin d'obtenir un film uniforme d'épaisseur $0,5 \mu m$. Les lamelles sont alors irradiées à l'aide d'une lampe UV à travers un masque transpercé des motifs recherchés. Ces motifs sont ensuite révélés en plongeant les lamelles dans un liquide développeur (Microchemicals) mélangé à l'eau distillée en quantité 1 :1.

Les lamelles sont ensuite laissées à incuber pendant deux heures à $37^{\circ}C$ dans une solution de PBS contenant $5 \mu g.mL^{-1}$ de fibronectine (F1141, Sigma-Aldrich) avant d'être rincées au PBS et à l'éthanol pur dans un bain d'ultra-sons afin de dissoudre la résine restante.

Pour finir, une solution contenant 3% de Pluronic (F127TM, Sigma-Aldrich) mélangé à l'eau est laissée à adsorber sur le motif complémentaire pendant 90 minutes à $37^{\circ}C$. Puis les lamelles sont une dernière fois rincées au PBS.

ANNEXE D

Marquages et microscopie confocale

Fixation et marquages

Les protocoles de marquage présentés ici ont été développés au laboratoire dans la thèse d'Amsha Proag sous la direction de Sylvie Hénon. Ils ont été réalisés par Alain Richert, qui a aussi pris les images au microscope confocale.

Les cellules sont fixées aux différentes étapes de l'étalement (3, 7, 15, 35 minutes après dépôt dans le milieu) en les couvrant d'une solution de paraphormaldéhyde (3 % dans du PBS) pendant 15 minutes. Elles sont ensuite perméabilisées à l'aide de Triton X-100 (15 min, 0.2% dans du PBS) et mises en présence de chlorure d'ammonium (30 min, 50mM dans du PBS) pour limiter le photo-blanchiment puis de BSA (30 min, 3% dans du PBS) pour saturer le cytoplasme et empêcher les marqueurs de se fixer sur des sites non-spécifiques.

Pour le marquage de l'actine, les cellules sont laissées à incuber pendant 60 minutes dans une solution contenant de la rhodamine-phalloïdine (0,1% dans du PBS) puis dans la BSA (1,5% dans du PBS).

Pour le marquage du noyau, les cellules sont laissées à incuber pendant 30 minutes dans une solution de DAPI (0,1% dans du PBS) puis dans la BSA (1,5% dans du PBS).

Microscopie confocale et reconstruction des images

Les cellules sont imagées à l'aide d'un dispositif confocal de Andor Technology couplé à un microscope Olympus IX-81, doté d'un objectif à huile 60X. Pour l'acquisition, l'espacement entre les plans focaux est le plus souvent de 250 μm .

Les images sont ensuite déconvoluées et passées au travers d'un filtre médian de *ImageJ* avant d'être reconstruites à l'aide de l'algorithme *3D Project* de *ImageJ*.

Détermination des volumes cellulaires

Le volume des cellules imagées au microscope confocal est déterminé à l'aide du logiciel de traitement d'image en 3D *FreeD* [Andrey & Maurin, 2005].

Ce logiciel détermine d'abord l'aire de l'objet d'intérêt dans chacune des coupes de la pile d'image. Cette opération est réalisée grâce à un algorithme classique de détection

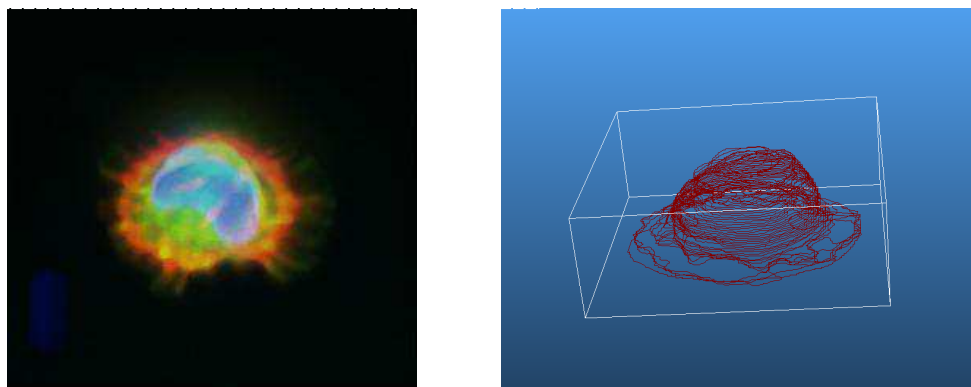


FIGURE D.1 – A gauche, image d’une cellule étalée depuis 20 minutes reconstruite à partir de plans en microscopie confocale. A droite, reconstruction à partir du logiciel *Freed*, chaque coupe correspond à un plan en microscopie confocale. Le volume est calculé à partir de l’aire de ces coupes.

des contours (*Snake*) dont l’utilisateur doit régler les paramètres. Ensuite, le logiciel construit et calcule le volume en reliant les bords de chacune des coupes.

Ici, pour déterminer l’aire des coupes, nous avons fourni au logiciel les images du canal de la paxilline car celle-ci est répartie de manière quasi-homogène dans la cellule. Nous avons auparavant appliqué un pré-traitement afin de lisser les images en les passant à travers un filtre médian de *ImageJ*.

Le volume reconstruit par le logiciel comparé aux images reconstruites a permis de montrer que cette technique produit très peu d’aberrations (voir illustration Fig D.1).

ANNEXE E

Calibration et lavage des lamelles

Calibration des lamelles

Afin de calibrer nos lamelles, nous appliquons à leur pointe une force à l'aide d'une lamelle étalon dont la raideur k_e est connue. Plus précisément, nous appliquons à l'aide d'un piézoélectrique des déplacements successifs d'amplitude D à la base de l'étalon. (Précisons que nous effectuons toutes ces opérations dans le rhéomètre à cellule unique qui est plus pratique pour effectuer ce genre de mesures.) Puis nous mesurons à l'écran la déflexion d induite à la pointe des deux lamelles (Fig E.1). Nous pouvons alors égaliser les forces :

$$k_e.(D - d) = k.d \quad (\text{E.1})$$

De là, nous déduisons facilement la raideur k de notre lamelle.

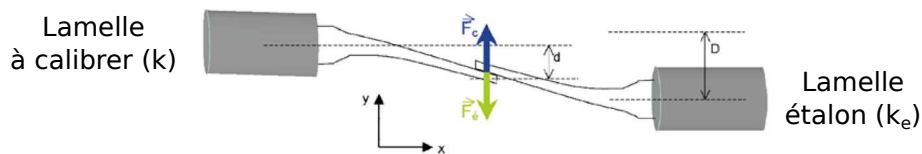


FIGURE E.1 – Illustration de la méthode de calibration des lamelles.

Lavage des lamelles

Après plusieurs expériences de traction (typiquement trois ou quatre), les lamelles sont recouvertes de nombreux débris cellulaires. Il devient alors nécessaire de les nettoyer. Pour cela, elles sont mises à tremper dans une solution de *Piranha* composée d'1/3 d'eau oxygénée et de 2/3 d'acide sulfurique. La mise en présence de ces deux réactifs crée une réaction exothermique dont un des produits (l'acide peroxy-sulfurique) est fortement oxydant. Nous laissons ainsi les lamelles à tremper une dizaine de minutes avant de les rincer plusieurs fois à l'eau distillée.

Cette procédure a l'avantage de nous permettre de réutiliser les lamelles dont la fabrication est très coûteuse en temps. Cependant, il faut noter qu'elle introduit une dissymétrie sur l'état de surface de nos deux lamelles. En effet, les lamelles de microscope qui nous servent de plaques rigides ne sont utilisées qu'une seule fois.

Bibliographie

- Alexandrova, A.Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J.M., Meister, J.J., Bershadsky, A.D., & Verkhovsky, A.B. 2008. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions : formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One*, **3**(9), e3234.
- Anderson, R.G.W. 1998. The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry*, **67**(1), 199–225.
- Andrey, P., & Maurin, Y. 2005. Free-D : an integrated environment for three-dimensional reconstruction from serial sections. *Journal of neuroscience methods*, **145**(1-2), 233–244.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., *et al.* . 2001. Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature cell biology*, **3**(5), 466–472.
- Balland, M., Desprat, N., Icard, D., Fereol, S., Asnacios, A., Browaeys, J., Henon, S., & Gallet, F. 2006. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Physical Review E*, **74**(2), 021911.
- Bar-Ziv, R., Thlusty, T., Moses, E., Safran, S.A., & Bershadsky, A. 1999. Pearling in cells : a clue to understanding cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(18), 10140.
- Barakat, A.I., Lieu, D.K., & Gojova, A. 2006. Secrets of the code : Do vascular endothelial cells use ion channels to decipher complex flow signals? *Biomaterials*, **27**(5), 671–678.
- Belamie, E., Mosser, G., Gobeaux, F., & Giraud-Guille, M.M. 2006. Possible transient liquid crystal phase during the laying out of connective tissues : α -chitin and collagen as models. *Journal of Physics : Condensed Matter*, **18**, S115.
- Bereiter-Hahn, J., Luck, M., Miebach, T., Stelzer, HK, & Voth, M. 1990. Spreading of trypsinized cells : cytoskeletal dynamics and energy requirements. *Journal of Cell Science*, **96**(1), 171–188.
- Bershadsky, A., Kozlov, M., & Geiger, B. 2006. Adhesion-mediated mechanosensitivity : a time to experiment, and a time to theorize. *Current opinion in cell biology*, **18**(5), 472–481.

- Blatti, S.P., Foster, D.N., Ranganathan, G., Moses, H.L., & Getz, M.J. 1988. Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**(4), 1119.
- Bruinsma, R. 2005. Theory of force regulation by nascent adhesion sites. *Biophysical journal*, **89**(1), 87–94.
- Buckley, M.R., Bergou, A.J., Fouchard, J., Bonassar, L.J., & Cohen, I. 2010. High-resolution spatial mapping of shear properties in cartilage. *Journal of biomechanics*, **43**(4), 796–800.
- Chaudhuri, O., Parekh, S.H., Lam, W.A., & Fletcher, D.A. 2009. Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells. *Nature methods*, **6**(5), 383–387.
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., & Ingber, D.E. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*, **276**(5317), 1425–1428.
- Chen, C.S., Alonso, J.L., Ostuni, E., Whitesides, G.M., & Ingber, D.E. 2003. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochemical and biophysical research communications*, **307**(2), 355–361.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., & Horwitz, A.R. 2008. Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology*, **10**(9), 1039–1050.
- Chowdhury, F., Na, S., Li, D., Poh, Y.C., Tanaka, T.S., Wang, F., & Wang, N. 2009. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature materials*, **9**(1), 82–88.
- Clark, E.A., & Brugge, J.S. 1995. Integrins and signal transduction pathways : the road taken. *Science*, **268**(5208), 233–239.
- Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J.V., Schwarz, U.S., & Stelzer, E.H.K. 2009. Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *Journal of cell science*, **122**(10), 1665–1679.
- Cooper, G.M., & Hausman, R.E. 2000. *The cell*. ASM press.
- Crow, A., Webster, K.D., Hohlfield, E., Ng, W.P., Geissler, P., & Fletcher, D.A. 2012. Contractile Equilibration of Single Cells to Step Changes in Extracellular Stiffness. *Biophysical Journal*, **102**(3), 443–451.
- Curtis, ASG. 1964. The mechanism of adhesion of cells to glass. *The Journal of cell biology*, **20**(2), 199–215.
- Cuvelier, D., Théry, M., Chu, Y.S., Dufour, S., Thiéry, J.P., Bornens, M., Nassoy, P., & Mahadevan, L. 2007. The universal dynamics of cell spreading. *Current biology*, **17**(8), 694–699.

- D'arcy, W.T. 1963. *On growth and form*. Cambridge University Press.
- De, R., Zemel, A., & Safran, S.A. 2007. Dynamics of cell orientation. *Nature Physics*, **3**(9), 655–659.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., & Sheetz, M.P. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, **323**(5914), 638.
- Desprat, N., & Asnacios, A. 2006. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Review of Scientific Instruments*, **77**(055111), 1–9.
- Desprat, N., Richert, A., Simeon, J., & Asnacios, A. 2005. Creep function of a single living cell. *Biophysical journal*, **88**(3), 2224–2233.
- Diacovo, TG, Roth, SJ, Buccola, JM, Bainton, DF, & Springer, TA. 1996. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*, **88**(1), 146–157.
- Discher, D.E., Mooney, D.J., & Zandstra, P.W. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, **324**(5935), 1673–1677.
- Döbereiner, H.G., Dubin-Thaler, B., Giannone, G., Xenias, H.S., & Sheetz, M.P. 2004. Dynamic phase transitions in cell spreading. *Physical review letters*, **93**(10), 108105.
- Dubin-Thaler, B.J., Giannone, G., Döbereiner, H.G., & Sheetz, M.P. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophysical journal*, **86**(3), 1794–1806.
- Eastwood, M., Mudera, VC, McGrouther, DA, & Brown, RA. 1998. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices : morphological changes. *Cell motility and the cytoskeleton*, **40**(1), 13–21.
- Endlich, N., Otey, C.A., Kriz, W., & Endlich, K. 2007. Movement of stress fibers away from focal adhesions identifies focal adhesions as sites of stress fiber assembly in stationary cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, **64**(12), 966–976.
- Engler, A., Bacakova, L., Newman, C., Hategan, A., Griffin, M., & Discher, D. 2004a. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal*, **86**(1), 617–628.
- Engler, A.J., Griffin, M.A., Sen, S., Bönnemann, C.G., Sweeney, H.L., & Discher, D.E. 2004b. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness. *The Journal of cell biology*, **166**(6), 877–887.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., & Discher, D.E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, **126**(4), 677–689.
- Étienne, J., Duperray, A., *et al.* . 2011. Initial dynamics of cell spreading are governed by dissipation in the actin cortex. *Biophysical Journal*, **101**(3), 611–621.

- Fabry, B., & Fredberg, J.J. 2007. Mechanotransduction, asthma and airway smooth muscle. *Drug Discovery Today : Disease Models*, **4**(3), 131–137.
- Fabry, B., Maksym, G.N., Butler, J.P., Glogauer, M., Navajas, D., & Fredberg, J.J. 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, **87**(14), 148102.
- Fardin, MA, Rossier, OM, Rangamani, P., Avigan, PD, Gauthier, NC, Vonnegut, W., Mathur, A., Hone, J., Iyengar, R., & Sheetz, MP. 2010. Cell spreading as a hydrodynamic process. *Soft Matter*, **6**(19), 4788–4799.
- Faust, U., Hampe, N., Rubner, W., Kirchgeßner, N., Safran, S., Hoffmann, B., & Merkel, R. 2011. Cyclic Stress at mHz Frequencies Aligns Fibroblasts in Direction of Zero Strain. *PloS one*, **6**(12), e28963.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V., & Gober, J.W. 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology*, **51**(5), 1321–1332.
- Fitts, R.H. 2008. The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *Journal of applied physiology*, **104**(2), 551–558.
- Fouchard, J., Mitrossilis, D., & Asnacios, A. 2011. Acto-myosin based response to stiffness and rigidity sensing. *Cell Adhesion & Migration*, **5**(1), 16.
- García-Cardena, G., Comander, J., Anderson, K.R., Blackman, B.R., & Gimbrone, M.A. 2001. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(8), 4478.
- Gaus, K., Le Lay, S., Balasubramanian, N., & Schwartz, M.A. 2006. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *The Journal of cell biology*, **174**(5), 725–734.
- Gauthier, N.C., Fardin, M.A., Roca-Cusachs, P., & Sheetz, M.P. 2011. Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(35), 14467–14472.
- Gilbert, S.F. 2004. *Biologie du développement*. De Boeck Supérieur.
- Gobeaux, F., Belamie, E., Mosser, G., Davidson, P., & Asnacios, S. 2010. Power law rheology and strain-induced yielding in acidic solutions of type I-collagen. *Soft Matter*, **6**(16), 3769–3777.
- Goldman, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P., & Steinert, P.M. 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *The Journal of cell biology*, **134**(4), 971–983.
- Gordon, A.R., & Siegman, M.J. 1971. Mechanical properties of smooth muscle. I. Length-tension and force-velocity relations. *American Journal of Physiology–Legacy Content*, **221**(5), 1243–1249.

- Guilak, F., Erickson, G.R., & Ting-Beall, H.P. 2002. The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes. *Biophysical journal*, **82**(2), 720–727.
- Guillou, H., Depraz-Depland, A., Planus, E., Vianay, B., Chaussy, J., Grichine, A., Albigès-Rizo, C., & Block, M.R. 2008. Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Experimental cell research*, **314**(3), 478–488.
- Harris, A.K., Wild, P., & Stopak, D. 1980. Silicone rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, **208**(4440), 177–179.
- Hill, AV. 1938. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **126**(843), 136–195.
- Icard-Arcizet, D., Cardoso, O., Richert, A., & Hénon, S. 2008. Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophysical journal*, **94**(7), 2906–2913.
- Izzard, C.S., & Lochner, L.R. 1980. Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility : an interference-reflexion study. *Journal of cell science*, **42**(1), 81–116.
- Jungbauer, S., Gao, H., Spatz, J.P., & Kemkemer, R. 2008. Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates. *Biophysical journal*, **95**(7), 3470–3478.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., & Waterman, C.M. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, **468**(7323), 580–584.
- Kapur, JN, Sahoo, P.K., & Wong, AKC. 1985. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer vision, graphics, and image processing*, **29**(3), 273–285.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O., Gimona, M., Beningo, K., Wang, Y.L., & Small, J.V. 2000. Enforced polarisation and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Current Biology*, **10**(12), 739–742.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, PJ, Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., & Wirtz, D. 2009. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(45), 19017–19022.
- Kuo, J.C., Han, X., Hsiao, C.T., Yates Iii, J.R., & Waterman, C.M. 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for [beta]-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nature Cell Biology*, **13**(4), 383–393.
- Ladoux, B., Anon, E., Lambert, M., Rabodzey, A., Hersen, P., Buguin, A., Silberzan, P., & Mège, R.M. 2010. Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophysical journal*, **98**(4), 534–542.

- Lam, W.A., Chaudhuri, O., Crow, A., Webster, K.D., Kita, A., Huang, J., Fletcher, D.A., *et al.* . 2010. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening. *Nature materials*, **10**(1), 61–66.
- Lam Hui, K., Wang, C., Grooman, B., Wayt, J., & Upadhyaya, A. 2012. Membrane Dynamics Correlate with Formation of Signaling Clusters during Cell Spreading. *Biophysical Journal*, **102**(7), 1524–1533.
- Levental, I., Georges, P.C., & Janmey, P.A. 2007. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*, **3**(3), 299–306.
- Levina, E.M., Kharitonova, M.A., Rovinsky, Y.A., & Vasiliev, J.M. 2001. Cytoskeletal control of fibroblast length : experiments with linear strips of substrate. *Journal of Cell Science*, **114**(23), 4335–4341.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. 1995. *Molecular cell biology*. Wiley Online Library.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., & Carlier, M.F. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**(6753), 613–616.
- Mader, C.C., Hinchcliffe, E.H., & Wang, Y. 2007. Probing cell shape regulation with patterned substratum : requirement of myosin II-mediated contractility. *Soft Matter*, **3**(3), 357–363.
- Marcq, P., Yoshinaga, N., & Prost, J. 2011. Rigidity sensing explained by active matter theory. *Arxiv preprint arXiv :1109.1206*.
- Mattila, P.K., & Lappalainen, P. 2008. Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**(6), 446–454.
- Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., & Borisy, G.G. 2004. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery : pivotal role of the filament barbed end. *Cell*, **118**(3), 363–373.
- Mitchison, T.J., & Cramer, L.P. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **84**(3), 371–379.
- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Guirouy, A., Desprat, N., Rodriguez, N., Fabry, B., & Asnacios, A. 2009. Single-cell response to stiffness exhibits -like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(43), 18243–18248.
- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Pereira, D., Postic, F., Richert, A., Saint-Jean, M., & Asnacios, A. 2010. Real-time single-cell response to stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(38), 16518–16523.
- Mizuno, D., Bacabac, R., Tardin, C., Head, D., & Schmidt, C.F. 2009. High-resolution probing of cellular force transmission. *Physical review letters*, **102**(16), 168102.
- Mogilner, A., & Oster, G. 2003. Force generation by actin polymerization II : the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophysical journal*, **84**(3), 1591–1605.

- Monteiro, E., Yvonnet, J., He, Q.C., Cardoso, O., & Asnacios, A. 2011. Analyzing the interplay between single cell rheology and force generation through large deformation finite element models. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, **10**(6), 813–830.
- Mooney, D.J., Langer, R., & Ingber, D.E. 1995. Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *Journal of Cell Science*, **108**(6), 2311.
- Murrell, M., Pontani, L.L., Guevorkian, K., Cuvelier, D., Nassoy, P., & Sykes, C. 2011. Spreading Dynamics of Biomimetic Actin Cortices. *Biophysical Journal*, **100**(6), 1400–1409.
- Na, S., Collin, O., Chowdhury, F., Tay, B., Ouyang, M., Wang, Y., & Wang, N. 2008. Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Science's STKE*, **105**(18), 6626.
- Nicolas, A., Geiger, B., & Safran, S.A. 2004. Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(34), 12520.
- Niggli, V. 1999. Rho-kinase in human neutrophils : a role in signalling for myosin light chain phosphorylation and cell migration. *FEBS letters*, **445**(1), 69–72.
- Nobes, C.D., & Hall, A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**(1), 53.
- Norman, L.L., Brugués, J., Sengupta, K., Sens, P., & Aranda-Espinoza, H. 2010. Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells. *Biophysical journal*, **99**(6), 1726–1733.
- Ochsner, M., Textor, M., Vogel, V., & Smith, M.L. 2010. Dimensionality controls cytoskeleton assembly and metabolism of fibroblast cells in response to rigidity and shape. *PloS one*, **5**(3), e9445.
- Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F., *et al.* . 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, **385**(6616), 537–540.
- Partridge, M.A., & Marcantonio, E.E. 2006. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Molecular biology of the cell*, **17**(10), 4237–4248.
- Pelham, R.J., & Wang, Y. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(25), 13661.
- Pignatelli, M. 1998. Integrins, cadherins, and catenins : molecular cross-talk in cancer cells. *The Journal of pathology*, **186**(1), 1–2.

- Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M., & Théry, M. 2010. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *The Journal of cell biology*, **191**(2), 303–312.
- Pollard, T.D., & Borisy, G.G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**(4), 453–465.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., & Danuser, G. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*, **305**(5691), 1782–1786.
- Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A., & Bokoch, G.M. 1998. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell*, **9**(7), 1863–1871.
- Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T., & Lenne, P.F. 2008. Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nature cell biology*, **10**(12), 1401–1410.
- Reinhart-King, C.A., Dembo, M., & Hammer, D.A. 2005. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophysical journal*, **89**(1), 676–689.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., Hall, A., *et al.* . 1992a. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**(3), 401.
- Ridley, A.J., Hall, A., *et al.* . 1992b. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**(3), 389.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., & Bershadsky, A.D. 2001. Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology*, **153**(6), 1175.
- Roca-Cusachs, P., Alcaraz, J., Sunyer, R., Samitier, J., Farré, R., & Navajas, D. 2008. Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation. *Biophysical journal*, **94**(12), 4984–4995.
- Rossier, O.M., Gauthier, N., Biais, N., Vonnegut, W., Fardin, M.A., Avigan, P., Heller, E.R., Mathur, A., Ghassemi, S., Koeckert, M.S., *et al.* . 2010. Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts. *The EMBO journal*, **29**(6), 1055–1068.
- Rottner, K., Hall, A., & Small, J.V. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology*, **9**(12), 640–648.
- Saez, A., Buguin, A., Silberzan, P., & Ladoux, B. 2005. Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces ? *Biophysical journal*, **89**(6), L52–L54.

- Saez, A., Ghibaudo, M., Buguin, A., Silberzan, P., & Ladoux, B. 2007. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(20), 8281.
- Satir, P., & Christensen, S.T. 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.*, **69**, 377–400.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., & Sheetz, M.P. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, **127**(5), 1015–1026.
- Sebé-Pedrós, A., Roger, A.J., Lang, F.B., King, N., & Ruiz-Trillo, I. 2010. Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(22), 10142.
- Senju, Y., & Miyata, H. 2009. The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *Journal of biochemistry*, **145**(2), 137–150.
- Shemesh, T., Geiger, B., Bershadsky, A.D., & Kozlov, M.M. 2005. Focal adhesions as mechanosensors : a physical mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(35), 12383.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., Schlaepfer, D.D., *et al.* . 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature cell biology*, **2**(5), 249–256.
- Sinha, B., Koster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., *et al.* . 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, **144**(3), 402–413.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., & Janmey, P.A. 2007. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophysical journal*, **93**(12), 4453–4461.
- Stricker, J., Aratyn-Schaus, Y., Oakes, P.W., & Gardel, M.L. 2011. Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions. *Biophysical Journal*, **100**(12), 2883.
- Suresh, S. 2007. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, **55**(12), 3989–4014.
- Tamada, M., Sheetz, M.P., & Sawada, Y. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental cell*, **7**(5), 709–718.
- Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K., & Chen, C.S. 2003. Cells lying on a bed of microneedles : an approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(4), 1484–1489.
- Taylor, A.C. 1961. Attachment and spreading of cells in culture. *Experimental cell research*, **8**, 154–173.

- Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y., & Bornens, M. 2006. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton*, **63**(6), 341–355.
- Tinevez, J.Y., Schulze, U., Salbreux, G., Roensch, J., Joanny, J.F., & Paluch, E. 2009. Role of cortical tension in bleb growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(44), 18581–18586.
- Trepat, X., Deng, L., An, S.S., Navajas, D., Tschumperlin, D.J., Gerthoffer, W.T., Butler, J.P., & Fredberg, J.J. 2007. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, **447**(7144), 592–595.
- Turner, C.E. 2000. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature cell biology*, **2**(12), E231–E236.
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., & Fuchs, E. 2002. Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Developmental cell*, **3**(3), 367–381.
- Versaevol, M., Grevesse, T., & Gabriele, S. 2012. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nature Communications*, **3**, 671.
- Vogel, V., & Sheetz, M. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews molecular cell biology*, **7**(4), 265–275.
- Von Wichert, G., Haimovich, B., Feng, G.S., & Sheetz, M.P. 2003. Force-dependent integrin–cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *The EMBO journal*, **22**(19), 5023–5035.
- Wang, J.H.C., & Thampatty, B.P. 2006. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, **5**(1), 1–16.
- Wang, N., Butler, J.P., & Ingber, D.E. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, **260**(5111), 1124–1127.
- Wang, N., Naruse, K., Stamenović, D., Fredberg, J.J., Mijailovich, S.M., Tolić-Nørrelykke, I.M., Polte, T., Mannix, R., & Ingber, D.E. 2001. Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(14), 7765.
- Webster, K.D., Crow, A., & Fletcher, D.A. 2011. An AFM-based stiffness clamp for dynamic control of rigidity. *PLoS One*, **6**(3), e17807.
- Wolfenson, H., Henis, Y.I., Geiger, B., & Bershadsky, A.D. 2009. The heel and toe of the cell's foot : a multifaceted approach for understanding the structure and dynamics of focal adhesions. *Cell motility and the cytoskeleton*, **66**(11), 1017–1029.
- Wong, M., & Carter, D.R. 2003. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology : a research perspective. *Bone*, **33**(1), 1–13.

- Woods, A.J., Roberts, M.S., Choudhary, J., Barry, S.T., Mazaki, Y., Sabe, H., Morley, S.J., Critchley, D.R., & Norman, J.C. 2002. Paxillin associates with poly (A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(8), 6428.
- Xiong, Y., Rangamani, P., Fardin, M.A., Lipshtat, A., Dubin-Thaler, B., Rossier, O., Sheetz, M.P., & Iyengar, R. 2010. Mechanisms controlling cell size and shape during isotropic cell spreading. *Biophysical journal*, **98**(10), 2136–2146.
- Yamada, K.M., & Even-Ram, S. 2002. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nature cell biology*, **4**(4), E75–E76.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., & Shibata, M. 2010. α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology*, **12**(6), 533–542.
- Yoshigi, M., Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Yost, H.J., & Beckerle, M.C. 2005. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology*, **171**(2), 209.
- Zamir, E., & Geiger, B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, **114**(20), 3583–3590.
- Zemel, A., Rehfeldt, F., Brown, AEX, Discher, DE, & Safran, SA. 2010. Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells. *Nature physics*, **6**(6), 468–473.
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S.J., Critchley, D.R., & Sheetz, M.P. 2008. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nature cell biology*, **10**(9), 1062–1068.
- Zhang, Y.L., Frangos, J.A., & Chachisvilis, M. 2006. Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, **347**(3), 838–841.
- Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A.M., & Burridge, K. 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *The Journal of cell biology*, **141**(2), 539–551.

Titre : RELATION ENTRE FORME, TENSION ET ADHÉSION AU COURS DE L'ÉTALEMENT D'UNE CELLULE ANIMALE

Résumé : Chaque cellule d'un animal possède le même génome. Pourtant, ces cellules peuvent avoir des phénotypes (ou fonctions) très différent(e)s. En particulier, leur forme et leur architecture peuvent être très variables. Or, il a été démontré que l'environnement mécanique pouvait influencer la forme et plus généralement le phénotype cellulaire. On peut donc se demander comment une cellule acquiert une forme, et quelle place joue l'environnement mécanique dans ce processus. Ceci devrait nous permettre de comprendre, à terme, comment ces deux paramètres participent à l'établissement de la fonction cellulaire.

D'un point de vue mécanique, une forme résulte d'un équilibre de forces entre l'intérieur et l'extérieur. Dans la cellule, les forces tensiles exercées par le cytosquelette d'acto-myosine sont transmises au substrat à travers des agrégats de protéines que l'on nomme "complexes d'adhésion".

Dans cette thèse, nous avons étudié l'étalement précoce de fibroblastes Ref-52, événement au cours duquel ces cellules passent d'une forme sphérique, où aucune tension n'est transmise au substrat, à une forme étalée isotrope, où les cellules compriment le substrat. Afin de déterminer comment la création de sites d'adhésion corrèle avec la tension transmise au substrat pendant l'étalement, nous avons mis au point un dispositif capable à la fois de mesurer les forces de traction à l'échelle cellulaire en géométrie uniaxiale et d'imager la réorganisation des complexes d'adhésion par microscopie à ondes évanescentes (TIRF). Grâce à ce dispositif, nous sommes parvenus à un scénario de l'étalement en deux phases. Lors de la première phase, l'étalement est rapide, la force est nulle et aucun complexe d'adhésion n'est formé. La transition vers la seconde phase semble gouvernée par un changement de forme du corps cellulaire, lorsque l'angle qu'il forme avec le substrat dépasse 90° . Suite à cette transition, la force commence à croître suivie par l'apparition des adhésions, puis l'étalement se fait plus lent.

Nous avons ensuite cherché à savoir comment l'environnement mécanique des cellules (rigidité et géométrie) pouvait affecter ce scénario. Pour cela, nous avons d'abord fait varier la raideur effective de notre senseur de force, puis nous avons comparé les caractéristiques du contact adhésif lorsque la cellule s'étale sur une plaque et entre deux plaques. Les résultats obtenus lors de ces expériences sont en cours d'analyse, mais mettent déjà en avant l'existence de paramètres géométriques conservés.

Mots-clés : Mécanique cellulaire, complexes d'adhésion, tension acto-myosine, mécano-sensibilité, étalement cellulaire, micro-plaques.
